

JULIANO MACHADO

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO SOBRE
PARÂMETROS ENVOLVIDOS NA ATROFIA MUSCULAR ESQUELÉTICA
INDUZIDA PELA IMOBILIZAÇÃO EM RATOS**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, área de concentração, Fisiologia da Performance no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

JULIANO MACHADO

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO SOBRE
PARÂMETROS ENVOLVIDOS NA ATROFIA MUSCULAR ESQUELÉTICA
INDUZIDA PELA IMOBILIZAÇÃO EM RATOS**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física com ênfase em Fisiologia da Performance no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Educação Física



TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANO MACHADO

“Efeitos da Suplementação com B-Hidroxi-B-Metilbutirato Sobre a Atrofia Muscular Esquelética Induzida pelo Desuso”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física – Área de Concentração Exercício e Esporte, Linha de Pesquisa Fisiologia da Performance, do Departamento de Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Orientador)
Departamento de Educação Física / UFPR

Professora Dra. Anna Raquel Silveira Gomes
Membro Interno

Professor Dr. Luiz Carlos C. Navegantes
Membro Externo

Curitiba, 13 de Abril de 2010

Campus Jardim Botânico–CEP: 80.215-370 – Curitiba/PR
Telefone: (41) 3362-8745 Fax (41) 3360-4336
email: mestrado_edf@ufpr.br danieldias@ufpr.br

www.edf.ufpr.br

À minha família e a minha noiva e futura esposa,
Por acreditarem que eu conseguiria, apesar de todos os contratempos.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Agradeço muito aos meus pais Luiz Marcos Machado e especialmente a minha mãe, Rozenilda da Costa Machado (*in memoriam*), por terem me dado tudo que um homem precisa, ou seja, caráter, força e dignidade para conquistar as suas metas e sonhos! Aos meus irmãos, muito obrigado por tudo, mas não posso de agradecer em especial minhas irmãs Neneca (Silvonete), Luciana e Silvia, vocês são o meu suporte, obrigado por tudo! AMO MUITO VOCES!

A minha melhor amiga e também minha única namorada, noiva, esposa, amante e companheira Verônica Bittencourt da Silva. Só você sabe o quanto você é importante em minha vida, na verdade, você é minha vida, é minha família, e minhas palavras não cobrem os sentimentos bons que tenho por ti. Você sempre esteve junto de mim tanto nos momentos mais difíceis, assim como nos melhores da minha vida, e com certeza, você tem uma importante parcela em tudo que sou hoje. Obrigado por me ajudar até nas correções da dissertação, como erros de português, citações e referencias. Por você ser assim, os sentimentos bons que tenho por ti crescem cada vez mais. TE AMO MUITO!

Ao professor Dr. Luiz Claudio Fernandes! Por ter aceitado me orientar mesmo sabendo que eu nem sabia o que era uma pipeta. Você é incrível, e ao assistir a disciplina de regulação de metabolismo intermediário, minha admiração cresceu ainda mais. Obrigado por todos os ensinamentos, profissionalismo, companheirismo, acessibilidade e amizade. Espero um dia ser um pouco do que você é como pessoa e pesquisador, e para isto, tenho que trabalhar muito!

Eu tenho muito a agradecer ao Ricardo Key Yamazaki por todos os ensinamentos. Obrigado pela paciência e dedicação em me ensinar a realizar um SDS-PAGE e o western blotting, calcular a concentração molar de vários sais para seus respectivos tampões ou soluções, por conversar comigo sobre dúvidas e auxiliar-me nas mesmas, etc., você foi determinante para que eu chegasse onde

chequei. Nossas conversas sobre o big brother Brasil 10 também foram muito gratificantes. Você é incrível, e eu quero muito um dia ser um pouco do que você é como pessoa e pesquisador!

Ao Everson Araújo Nunes, por todas as ajudas fornecidas tanto no início do trabalho (antes de você ir para a Inglaterra) como nos momentos finais (após sua volta da Inglaterra). Somente hoje eu entendo que trabalhar com western blotting não é fácil, e, que é muito fácil inserir inúmeros objetivos num projeto, difícil é cumpri-lo, e, que na pesquisa, nem sempre se obtém o que se espera. Valeu mesmo por sua ajuda, paciência, profissionalismo e amizade. Espero um dia ser um pouco do que você como pessoa e pesquisador!

Mas acima de tudo, agradeço muito a todos do laboratório de metabolismo celular, sem vocês, eu não teria terminado este mestrado. E quando eu resolvi nos últimos cinco meses para o término do mestrado mudar de projeto porque estava decepcionado com os meus resultados, vocês me ajudaram muito. Sendo assim, não posso deixar de citá-los: Gleisson, Everson, Ricardo, Marcelo, Isabela, Gina, Júlia, Dalton e Ricelli, a Kátia, esposa do professor Luiz por ensinar a tirar foto no microscópio de captura de imagem e a agradeço muito a professora Lucélia Donatti por ter feito minhas laminas de microscopia eletrônica e disponibilizado os materiais para a ótica.

Agradeço muito a professora Dra. Anna Raquel S. Gomes por suas dicas preciosas sobre o modelo de imobilização, por ter esclarecidos inúmeras dúvidas que tive sobre este modelo de indução de atrofia, e, por aceitar em participar da banca de minha defesa de mestrado. Eu lhe admiro muito, e espero ser um pouco do que você é!

Agradeço muito ao professor Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes por ter me enviado o protocolo de ensaio de proteólise, por ter me recebido muito bem em seu laboratório e por aceitar em participar da banca de minha defesa de mestrado. Eu também lhe admiro muito, e espero ser um pouco do que você é!

Agradeço também ao professor Dr. João Durigan por ter me ensinado pelo skype e pelo email como analisar a área de secção transversa das fibras musculares, você é incrível!

Agradeço ao secretário Daniel Dias e ao programa de pós graduação de mestrado e doutorado em Educação Física da UFPR por tudo!

Ao pessoal do biotério da UFPR, por sempre nos ajudar em tudo que precisávamos, e, aos ratos por contribuírem diretamente com esta pesquisa.

Agradeço a todos os meus amigos e companheiros tanto da minha cidade como do mestrado e da república que eu moro! Porém, não citarei nomes, pois se fizer, eu não terei dinheiro suficiente para imprimir a dissertação. E se eu me esqueci de alguém, desculpem-me, eu agradeço pessoalmente!

E por fim ao CNPq, por toda a ajuda financeira fornecida. Isto foi determinante para o término deste mestrado. Também foi determinante para fazer-me sair de uma vida de miojo e salsicha, para bolachinha recheada, salgadinho, refrigerante, pagar o aluguel e etc.!

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.3 HIPÓTESES.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 PLASTICIDADE MÚSCULAR ESQUELÉTICA 4	
2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA PELO DESUSO.....	5
2.2.1 Via de proteolítica dependente das catepsinas	6
2.2.2 Via proteolítica das calpaínas dependentes de Ca^{2+}	6
2.2.3 Via proteolítica dependente das Caspases	7
2.2.4 Via Proteolítica dependente do proteassoma	8
2.3 TRANSDUÇÃO DE SINAL E PROTEÓLISE NA ATROFIA MUSCULAR.....	9
2.3.1 Relação entre a via da PI3K-Akt e FoxO na Atrofia Muscular	9
2.3.2 NF- κ B como Molécula de Sinalização na Atrofia Muscular	10
2.4 EFEITOS METABÓLICOS DA ATROFIA MUSCULAR PELO DESUSO.....	12
2.4.1 Efeitos da Atrofia Muscular Induzida pelo Desuso sobre a Sinalização da Insulina.....	13
2.5 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA.....	13
2.5.1 O Estresse Oxidativo Ativa a Sinalização pela MAPK.....	14
2.5.2 Ativação da Via de Sinalização Dependente da ERK no Estresse Oxidativo	15
2.5.3 Regulação Redox da Sinalização do NF- κ B	15
2.6 MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES QUE REGULAM A SÍNTESE PROTÉICA.....	16
2.6.1 Passo 1: Formação do Complexo de Pré-iniciação 43S Dependente do eIF2.....	16
2.6.2 Passo 2: Reconhecimento da Estrutura m ⁷ GTP RNAm “Cap” dependente do eIF4	18
2.6.3 Formação do Complexo eIF4F Fosforilação-dependente.....	20
2.7 ADAPTAÇÃO DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA A AUMENTADA SOBRECARGA.....	22
2.8 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA.....	24
2.8.1 Efeitos sobre a Síntese Protéica através da Suplementação com Leucina.....	24
2.8.2 Efeitos anti-proteolítico através da Suplementação com Leucina.....	26
2.8.3 Metabolismo da Leucina e Produção de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB).....	27
2.8.4 Doses Utilizadas, Segurança e Efeitos Adversos.....	29
2.8.5 Cinética após a Ingestão.....	30
2.8.6 Efeitos da Suplementação com HMB sobre a Sinalização Intracelular.....	31
2.8.7 β -hidroxi- β -metilbutirato e Atrofia Muscular induzida pelo Desuso.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 REAGENTES, ENZIMAS E SOLUÇÕES.....	35
3.2 ANIMAIS.....	35
3.3 MODELO EXPERIMENTAL.....	37

3.4	PESAGEM DOS ANIMAIS E DO SOLÉO.....	39
3.5	SUPLEMENTAÇÃO COM HMB.....	39
3.6	ORTOTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS MÚSCULOS PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA.....	40
3.7	METODOLOGIA ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTÉICO.....	41
3.7.1	Quantificação protéica para as análises da síntese protéica	41
3.7.2	Separação eletroforética das proteínas	42
3.7.3	Western blotting	42
3.8	METODOLOGIA PARA AS ANÁLISES HISTOLÓGICAS DOS MÚSCULOS.....	43
3.8.1	Microscopia de luz	43
3.8.2	Microscopia eletrônica de transmissão	45
3.9	METODOLOGIAS PARA AS ANÁLISES BIOQUÍMICAS E METABÓLICAS	45
3.9.1	Avaliação da taxa de proteólise total para os animais submetidos a imobilização de sete dias	46
3.9.2	Avaliação da taxa de proteólise total para os animais submetidos ao jejum de 48 horas	48
3.9.3	Peroxidação lipídica da musculatura esquelética.....	49
3.9.3.1	Quantificação protéica para a dosagem de lipoperóxidos da musculatura esquelética	51
3.9.4	Produção de lactato em meio de incubação	51
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	55
5.1	MENSURAÇÃO DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS ENTRE O INÍCIO E O FINAL DO PERÍODO EXPERIMENTAL.....	55
5.2	PESO DO SÓLEO DOS ANIMAIS.....	56
5.3	RELAÇÃO ENTRE O PESO DO SÓLEO PELA MASSA CORPORAL TOTAL DOS ANIMAIS.....	57
5.4	ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS.....	57
5.5	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS.....	59
5.6	PROTEÓLISE TOTAL DOS MÚSCULOS IMOBILIZADOS.....	63
5.7	PROTEÓLISE TOTAL DOS MÚSCULOS DOS ANIMAIS EM JEJUM.....	64
5.8	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA.....	66
5.9	EXPRESSÃO PROTÉICA DA SUBUNIDADE p65 DO NF- κ B.....	67
5.10	PRODUÇÃO DE LACTATO DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA EM MEIO DE INCUBAÇÃO.....	68
6.	DISCUSSÃO	69
7.	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	82
8.	CONCLUSÃO	83
9.	REFERÊNCIAS	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – síndrome da imunodeficiência;
AKT – proteína quinase B;
AP-1 – proteína ativadora 1;
Bak – Bcl-2 homologous antagonist/killer;
Bax – proteína X associada a Bcl-2;
Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*;
BCAAT – transaminase de aminoácido de cadeia ramificada;
BCKD – desidrogenase de alfa-cetoisocaproato;
C2C12 – linhagem de célula mioblástica de camundongos;
CaHMB – cálcio hidroximetilbutírico;
CaCO₃ – carbonato de cálcio;
DPOC – doença obstrutiva pulmonar crônica;
E1 – enzima ativante da ubiquitina;
E2 – enzima conjugante de ubiquitina;
E3 – enzima ligante de ubiquitina;
eIF – fator de iniciação eucariótico;
eEF – fator de alongação eucariótico;
eEF2K – proteína quinase do eEF2;
ERK – proteína quinase ativada por estresse extra-celular ou MAPK;
EROs – espécies reativas de oxigênio;
EGF – fator de crescimento epidermal;
FAD – flavina adenina dinucleotídeos;
FADH – FAD na forma reduzida;
FoxO – *forkhead box O*;
GCN2 – proteína quinase 4 do eIF2-alfa;
GLUT-4 – transportador de glucose 4;
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio;
HMB – beta-hidroxi-beta-metilbutirato;
HMG-CoA – beta-hidroxi-beta-metilglutaril CoA;
IGF-1 – fator de crescimento semelhante a insulina 1;
IGF-1Ea – isoforma do IGF-1Ea secretada pelo fígado;

IGF-R1 – receptor de IGF-1;
IKB – proteína inibidora do NF- κ B;
IKK – proteína quinase do IKB;
IR-beta – subunidade beta do receptor de insulina;
IRS-1 substrato do receptor de insulina 1 - ;
JNK – *c-Jun NH₂-terminal*;
KIC/CIC – alfa-cetoisocaproato;
KICD – dioxigenase do KIC;
LDH – enzima lactato desidrogenase;
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno;
MuRF1 – *muscle-specific Ring finger -1*;
MAFbx – *muscle atrophy F-box, atrogin-1* ou atrogina-1;
MIKK – IKK específica do Músculo esquelético;
MGF – fator de crescimento mecânico;
MyoD – proteína da família dos fatores regulatórios miogénicos;
mTOR – alvo da rapamicina de mamíferos;
PI3k – fosfatidilinositol 3 quinase;
MHC – cadeia pesada de miosina;
NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo;
NADH – NAD na forma reduzida;
NO – óxido nítrico;
NF- κ B – fator nuclear kappa B;
PKR – proteína quinase do RNA de dupla fita;
PDGF – fator de crescimento derivado das plaquetas;
PKC – proteína quinase C;
PIF – fator indutor de proteólise;
RNA – ácido ribonucleico;
RNAm – RNA mensageiro;
tRNA – RNA transportador;
TGF – fator de crescimento transformador;
TNF- α – fator de necrose tumoral;

LISTA ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Passo 1 da fase de iniciação da tradução de RNAm eucariótico	17
FIGURA 2 – Passo 2 da via de iniciação da tradução do RNAm eucariótico	19
FIGURA 3 – Estrutura esquemática e regulação do eIF4E e 4E-BP1	20
FIGURA 4 – Via de iniciação da tradução nas células dos mamíferos. Ligação do ..	21
FIGURA 5 – Cascata de sinalização ativada pelo IGF-1/PI3K/Akt	23
FIGURA 6 – Eventos de sinalização na estimulação na iniciação da tradução pela leucina.	25
FIGURA 7 – Visão geral do metabolismo da leucina, α -cetoisocaproato e do HMB ..	27
FIGURA 8 – Efeito inibitório do HMB sobre as vias responsáveis pela proteólise em células musculares esqueléticas.....	33
FIGURA 9 – Contribuição relativa da taxa de síntese e de degradação de proteínas miofibrilares de um músculo sóleo de animal submetido a suspensão da cauda	36
FIGURA 10 – Procedimentos de imobilização da pata posterior esquerda do rato ...	38
FIGURA 11 – Representação esquemática da distribuição dos grupos.	39
FIGURA 12 – Processo de isolamento do músculo sóleo.....	41
FIGURA 13 – Representação esquemática da redução dos hidroperóxidos lipídicos em hidróxidos lipídicos catalisado pela trifenilfosfina (TPP).	49
FIGURA 14 – Representação esquemática da oxidação dos Fe^{2+} pelos hidroperóxidos (X-OOH).	50
FIGURA 15 – Massa corporal total dos animais submetidos ao procedimento de imobilização da pata posterior esquerda, no início (dia 0) e ao final de 7 dias de suplementação ou não (Controle - C) com HMB.....	55
FIGURA 16 – Peso dos músculos sóleo dos animais ao final do período experimental	56
FIGURA 17 – Peso dos músculos sóleo corrigido pela massa corporal dos animais ao final do período experimental	57
FIGURA 18 – Área de secção transversa das fibras musculares dos músculos sóleo obtidos dos animais controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementado HMB e pata imobilizada e suplementados com HMB	58
FIGURA 19 – Micrografia eletrônica de transmissão, da secção longitudinal miofibrilar do músculo sóleo obtido dos animais.	60
FIGURA 20 – Micrografia eletrônica de transmissão da secção transversal do músculo sóleo obtido dos animais.	62
FIGURA 21 – Determinação da proteólise muscular, ao final de 120 minutos de incubação, mensurada pela liberação de tirosina dos músculos sóleos obtidos dos animais dos grupos controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementados com HMB (HMB) e, pata imobilizada e suplementados com HMB (Imob-HMB)	63
FIGURA 22 – Determinação proteólise total, pela liberação de tirosina, pelos músculos sóleos, obtidos dos animais alimentados, submetidos a um jejum de dois dias suplementados com HMB (Jejum+HMB) ou o veículo (Jejum+ CaCO_3).	64
FIGURA 23 – Determinação proteólise total, pela liberação de tirosina, pelos músculos EDL, obtidos dos animais alimentados, submetidos a um jejum de dois dias suplementados com HMB (Jejum+HMB) ou o veículo (Jejum+ CaCO_3)	65

FIGURA 24 – Peroxidação lipídica nos músculos sóleos obtidos dos animais controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementado com HMB e, pata imobilizada suplementados com HMB (Imob-HMB).	66
FIGURA 25 – Expressão protéica da subunidade p65 do NF-kB em unidades arbitrárias (U.A.), nos músculos sóleos obtidos dos animais controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementado com HMB e, pata imobilizada suplementados com HMB (Imob-HMB)	67
FIGURA 26 – Produção de lactato pelo músculo sóleo incubado obtido dos animais dos grupos controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementado com HMB e, pata imobilizada suplementados com HMB	68
FIGURA 27 – Vias que controlam simultaneamente a hipertrofia e a atrofia muscular esquelética.	69
FIGURA 28 – Taxa de síntese e degradação estimada no sóleo a partir do modelo de suspensão da cauda.....	74
FIGURA 29 – Ilustração das potenciais fontes de produção de EROs na musculatura esquelética.....	78

RESUMO

O treinamento resistido e o suporte nutricional estimulam a hipertrofia muscular. Inversamente, o repouso no leito, imobilização do membro, microgravidade, lesão da medula espinhal, lesão periférica, lesão tendínea, entre outros estímulos, resultam em atrofia muscular. A atrofia muscular pode surgir de situações como: elevação da proteólise, diminuição da síntese protéica ou ambas. A suplementação com β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), tem sido utilizada como medida anti-catabólica, em situações desde caquexia até lesões musculares induzidas pelo exercício. Diante disto, este estudo objetivou verificar quais os efeitos da suplementação com HMB sobre a atrofia muscular induzida pela imobilização da pata posterior esquerda em posição de encurtamento de ratos Wistar, durante um período de sete dias. Foram realizadas as seguintes análises: massa corporal total; peso do sóleo; área de seção transversa das fibras musculares do sóleo; análise ultra-estrutural dos sarcômeros das fibras musculares do sóleo; proteólise total pela liberação de tirosina do músculo em meio de incubação; peroxidação lipídica; expressão protéica do NF- κ B e produção basal de lactato no meio de incubação. Os animais foram submetidos à imobilização da pata posterior esquerda em posição de encurtamento durante sete dias, divididos em dois grupos (HMB e placebo – CaCO_3), e, suplementados por gavagem com $76 \text{ mg.kg}^{-1}\text{d}^{-1}$ de HMB ou CaCO_3 . Foi verificado ao sétimo dia que a imobilização da pata posterior diminuiu a massa corporal total, o peso do sóleo, área de secção transversa das fibras musculares do sóleo e causou lesões nos sarcômeros das fibras musculares do sóleo em comparação aos dos músculos não imobilizados. Contudo, a suplementação com HMB não foi capaz de alterar estes parâmetros envolvidos na atrofia muscular em comparação ao placebo. Diferentemente do que se esperava, os músculos atrofiados não elevaram a taxa de proteólise em comparação à dos músculos contra-lateral controles. A expressão do NF- κ B não alterou nos músculos sujeitos à imobilização ou controles de ambos os grupos. A produção de lipoperóxidos, e a produção basal de lactato do sóleo em meio de incubação elevaram-se nos músculos atrofiados em comparação à dos contra-lateral, porém, a suplementação com HMB não alterou estes parâmetros. Diante destes resultados, conclui-se que a suplementação com HMB não foi capaz de alterar a atrofia muscular induzida pela imobilização, nem os parâmetros

envolvidos na atrofia muscular induzida pela imobilização. A falta de elevação na proteólise total dos músculos imobilizados em comparação aos controles, é uma indicativa de que os músculos imobilizados estão se atrofiando devido a uma diminuição da síntese protéica ao invés de um aumento na proteólise no sétimo dia.

Palavras-chave: HMB, atrofia muscular, imobilização, desuso.

ABSTRACT

Resistance training and nutritional support have been used to stimulate muscle hypertrophy. Conversely, bed rest, limb immobilization, microgravity, spinal cord injury, peripheral injury, tendon injury, and other stimuli result in muscle atrophy. Muscle atrophy can arise from situations such as: increased proteolysis, decreased protein synthesis, or both. Supplementation with β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) has been used as anti-catabolic agent in situations leading to cachexia and also to muscle damage induced by exercise. This study aimed to assess the effects of HMB supplementation on muscle atrophy induced by immobilization of the hindlimb in a shortened position of rats over a period of seven days. We measured the followed: total body mass, soleus muscle weight, cross-sectional area of soleus muscle fibers, ultra-structural analysis of the sarcomeres of muscle fibers of the soleus, overall proteolysis by the release of tyrosine from muscle incubation, peroxidation lipid, protein expression of NF- κ B and, basal production of lactate by the muscle. The animals were subjected to immobilization of the left hindlimb in a shortened position for seven days, and divided into two groups (HMB and placebo – CaCO_3), and supplemented by gavage with $76 \text{ mg.kg}^{-1}\text{d}^{-1}$ of HMB or CaCO_3 . We found that immobilization of the hindlimb reduced the total body mass, twweight of the soleus, cross-sectional area of muscle fibers of the soleus and caused damage to the sarcomeres of muscle fibers in soleus muscles when compared to non-immobilized. Supplementation with HMB was not able to change these parameters. Unlike what was expected, muscles atrophy did not increase the rate of proteolysis when compared to the contralateral muscles which were the control ones. The expression of NF- κ B was not altered in muscle from immobilized or controls of both groups. The production of lipidperoxide and basal production of lactate in the soleus incubated increased in the muscles atrophied when compared to the contralateral side. Again, HMB supplementation did not alter these parameters. In summary supplementation with HMB was not able to reversal the skeletal muscle atrophy induced by immobilization, or the parameters involved in muscle atrophy induced by immobilization. The lack of increase in total proteolysis of the immobilized muscles compared to controls, is indicative of the immobilized muscle are atrophying

due to a decrease in protein synthesis rather than an increase in proteolysis in the seventh day.

Key words: HMB, muscular atrophy, immobilization, disuse.

1. INTRODUÇÃO

A musculatura esquelética é um tecido altamente plástico capaz de alterar suas propriedades funcionais e bioquímicas de acordo com as alterações as quais ele é submetido.

É bem estabelecido que a sobrecarga crônica induzida pelo exercício resistido ou alongamento da musculatura esquelética resultam em alterações fenotípicas e morfológicas. Estas alterações resultam em aumento do conteúdo protéico intracelular e pode aumentar a capacidade de gerar força (ADAMS, *et al.*, 2004; ISHIHARA, *et al.*, 1998; SOARES, *et al.*, 2007). Muitas destas alterações estão muito bem estabelecidas, principalmente as relacionadas à síntese protéica (HERSHEY, 1991), no entanto, os mecanismos e os ativadores moleculares por trás desses processos estão começando a serem mais bem estudados e entendidos.

A perda de massa muscular esquelética é um fenômeno muito comum presentes em condições patológicas como o câncer, sepse e *diabetes mellitus*, e dependendo do estado do indivíduo, estas condições podem levar a caquexia e também ao óbito. Por outro lado, condições como diminuídos padrões habituais de atividade física, repouso no leito, imobilização de membros, desnervação muscular e exposição à microgravidade ou ausência de sobrecarga também levam à atrofia muscular (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). A perda de tecido muscular esquelético provocada por estas condições é um fenômeno conhecido como atrofia muscular induzida pelo desuso, onde as conseqüências funcionais e morfológicas comuns são: diminuída área de secção transversa da fibra muscular e do conteúdo protéico, reduzida produção de força e potência, e por fim, aumentadas fadigabilidade e resistência à insulina (PAVY-LE, *et al.*, 2007).

O desuso da musculatura esquelética, devido à diminuição da sobrecarga imposta, leva ao decréscimo na taxa de síntese protéica e ao aumento na taxa de degradação protéica (BAAR, *et al.*, 2006; JACKMAN; KANDARIAN, 2004). No entanto as moléculas e processos envolvidos na atrofia muscular são pouco conhecidos.

Atualmente, tem-se verificado que muitos agentes estão envolvidos com a atrofia muscular, e as utilizações de abordagens que atenuem o processo poderiam

ter importante impacto sobre a saúde e qualidade de vida do indivíduo que esteja numa condição de atrofia muscular.

Um metabólito do aminoácido essencial leucina, conhecido como β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), tem mostrado ser capaz de atenuar a perda de massa muscular no câncer (MAY, *et al.*, 2002), na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (CLARK, *et al.*, 2000) e na idade avançada (VUKOVICH, STUBBS, BOHLKEN, 2001). Na atrofia muscular induzida pelo câncer, o HMB foi mostrado ser capaz de atenuar a depressão da síntese protéica assim como reprimir o aumento da degradação protéica (SMITH, WYKE, TISDALE, 2005). No entanto, ainda não foi descrito o seu papel em músculos submetidos a atrofia induzida pela imobilização.

Diante das citações descritas acima sobre os efeitos da suplementação com HMB sobre condições catabólicas que levam a atrofia muscular esquelética, pode-se esperar que a suplementação com HMB, venha exercer efeitos fisiológicos positivos sobre a atrofia muscular esquelética induzida pela imobilização da pata posterior esquerda em posição de encurtamento durante um período de sete dias.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo principal analisar os efeitos da suplementação com β -hidroxi- β -metilbutirato sobre os parâmetros envolvidos na atrofia muscular esquelética induzida pelo desuso através da imobilização unilateral da pata posterior esquerda em posição encurtamento de ratos da linhagem Wistar.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar este objetivo, foram analisados os seguintes parâmetros:

- Massa corporal total e peso do músculo sóleo;
- Área de secção transversa do sóleo;
- Análise ultra-estrutural do sóleo;
- Expressão protéica da subunidade do fator nuclear kappa B (NF-kB);
- Proteólise total;
- Lipoperoxidação da musculatura esquelética; e
- Produção de lactato do músculo.

1.3 HIPÓTESES

- H_0 – A suplementação com HMB não atenuará a atrofia muscular induzida pelo desuso e os mecanismos envolvidos na atrofia;
- H_1 – A suplementação com HMB atenuará a atrofia muscular induzida pelo desuso e os mecanismos envolvidos na atrofia;

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLASTICIDADE MÚSCULAR ESQUELÉTICA

A musculatura esquelética é composta de uma heterogeneidade de fibras musculares, as quais diferem em sua capacidade fisiológica e metabólica. Esta diversidade permite que diferentes grupos musculares desempenhem uma variedade de propriedades funcionais. Em resposta a alterações as quais a musculatura esquelética é submetida, esta se remodela por meio da ativação das vias de sinalização que reprogramam a expressão gênica para sustentar a performance muscular.

Estudos que utilizam o exercício, estimulação elétrica, modelos de animais transgênicos, estados de doenças e microgravidade, tanto pela suspensão da pata posterior como pela exposição a uma situação chamada de *bed rest* (repouso total) mostram alterações na expressão gênica, mudança nas transições de fibras musculares em respostas as demandas funcionais (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006).

A musculatura esquelética têm importante capacidade de se ajustar aos diferentes estímulos. A sobrecarga mecânica resulta em crescimento radial da musculatura esquelética por meio da adição de sarcômeros em paralelo (GLASS, 2005; TSIKA, *et al.*, 1987), enquanto o alongamento pode levar à adição de sarcômeros em série, resultando em crescimento longitudinal, especialmente nos músculos sóleos, devido a sua posição anatômica (GRIFFIN, *et al.*, 1971).

Vias de sinalização dependente do cálcio, co-ativadores e co-repressores transcricionais, e, inúmeros fatores de transcrição também têm mostrado estar envolvidos no remodelamento muscular esquelética (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006). Um maior entendimento dos mecanismos envolvidos na modulação dos fenótipos músculos esqueléticos pode auxiliar no desenvolvimento de novas medidas terapêuticas para melhorar situações catabólicas e metabólicas encontradas em doenças neuromusculares, diabetes, câncer, desuso e performance muscular esquelética.

2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA PELO DESUSO

É bem estabelecido que o desuso da musculatura esquelética decorrente da baixa sobrecarga resulte em decréscimo na taxa de síntese protéica e aumento na taxa de degradação protéica (BAAR, *et al.*, 2006; LOUGHNA, *et al.*, 1986; JACKMAN; KANDARIAN, 2004). Sabe-se que na síntese protéica ocorre a tradução de um ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) à proteínas, nas fases de iniciação, alongação e terminação (KIMBALL; JEFFERSON, 2001), no entanto, a atrofia muscular induzida pelo desuso parece influenciar negativamente a iniciação traducional (JACKMAN; KANDARIAN, 2004).

A quantidade total do repressor traducional, proteína de ligação-1 do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP-1), ligado ao fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), é aumentada em 14 dias de baixa sobrecarga imposta sobre o músculo gastrocnêmio de ratos, o que sugere um envolvimento no decréscimo da taxa traducional observada na atrofia induzida pelo desuso (BODINE, *et al.*, 2001). Consistente com este achado, outro estudo também demonstrou que a atrofia muscular induzida pelo desuso leva a um marcado aumento no RNAm da proteína inibitória da iniciação da tradução, a 4E-BP-1 (STEVENSON, *et al.*, 2003). Além do mais, tem-se mostrado que o RNAm da proteína quinase do fator de alongação eucariótico-2 (eEF2K), um outro inibidor da síntese protéica, é auto-regulado em quatro dias de indução da atrofia pelo desuso, alcançando um pico de cinco vezes nos valores basais em sete dias (STEVENSON, *et al.*, 2003). A fosforilação do fator de iniciação eucariótico-2 (eEF2) pelo eEF2K resulta em redução global na biogênese ribossomal (WANG *et al.*, 2006). Portanto, aumento na expressão do eEF2K, poderia levar a decréscimo na capacidade de sintetizar proteína no músculo em estado de baixa sobrecarga ou de inatividade, mostrando que no desuso, a atrofia muscular parece ocorrer também pela diminuição da síntese protéica.

Existem quatro vias proteolíticas conhecidas que levam à atrofia muscular: a via de sinalização das catepsinas ou lisossomais; das calpaínas dependentes de cálcio (Ca^{2+}); das caspases e da ubiquitina proteassoma ATP-dependente (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; KANDARIAN; STEVENSON, 2002; KANDARIAN; JACKMAN, 2006).

2.2.1 Via de proteolítica dependente das catepsinas

Os lisossomos são organelas encapsuladas que contém grande número de proteases conhecidas como catepsinas B, D, H e L, assim como outras hidrolases ácidas. Tem-se mostrado que nove dias de suspensão da pata posterior resulta em perda de massa muscular no sóleo dos ratos submetidos a esta condição, devido à acentuada proteólise (TAILLANDIER, *et al.*, 1996).

Mensurações “*in vitro*” mostraram que a atividade das catepsinas B, B+L e calpaína-m aumentaram em 111%, 92% 180% respectivamente, juntamente com elevada concentração do RNAm destas proteases (TAILLANDIER, *et al.*, 1996). No entanto, quando esta via é comparada com a via proteolítica dependente de Ca^{2+} , a via lisossomal conta somente com 9% da taxa de proteólise total, e com a metade da proteólise induzida pela via das calpaínas (TAILLANDIER, *et al.*, 1996). Estas observações são consistentes com a atual visão de que as catepsinas não degradam proteínas citosólicas, como as proteínas miofibrilares. Ao invés disso, seu maior papel está na degradação de proteínas de membrana tais como receptores, canais de íons, transportadores (JACKMAN; KANDARIAN, 2004).

Recentemente foi demonstrado que a proteólise dependente da autofagia/lisossomal apresenta mecanismos mais complexos, após as análises em músculos de ratos atrofiados devido à desnervação (ZHAO, *et al.*, 2008). Foi relatado que há uma diminuída atividade da via de sinalização do IGF-1/PI3K/Akt e uma aumentada autofagia por meio do fator de transcrição FoxO3, e uma regulação coordenada entre os sistemas proteassomal e lisossomal (ZHAO, *et al.*, 2008). Estas evidências nos mostram o quanto os mecanismos indutores de atrofia operam harmonicamente um com o outro e o quanto é importante um maior conhecimento de como estes mecanismos operam, para entrar com uma medida que evite ou atenuar esta condição.

2.2.2 Via proteolítica das calpaínas dependentes de Ca^{2+}

As calpaínas fazem parte de uma grande família de proteases cisteínas dependentes de Ca^{2+} . As fibras musculares esqueléticas contém as calpaínas-1 e -2, e uma calpaína específica do músculo conhecida como calpaína -3 ou p94 (GOLL, *et al.*, 2003). Pouco se sabe sobre os precisos papéis das calpaínas na regulação

normal da musculatura esquelética, embora provavelmente elas estejam envolvidas na organização do citoesqueleto, ciclo celular e apoptose (GOLL, *et al.*, 2003).

O aumento nas concentrações de Ca^{2+} intracelulares pode ativar as calpaínas concentradas no disco-Z (KANDARIAN; STEVENSON, 2002), e aumentar a proteólise muscular. Tem-se demonstrado que as calpaínas degradam proteínas como a fodrina, nebulina (VERMAELEN, *et al.*, 2007), titina, proteína-C, vinculina entre outras, as quais são conhecidas substratos das calpaínas (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). Assim, a clivagem da titina, proteína que mantém o alinhamento do sarcômero, permite a liberação das miofibrilas para serem ubiquitinadas e subsequentemente degradadas no proteassoma (KANDARIAN; STEVENSON, 2002), pois o proteassoma não é capaz de degradar proteínas intactas. Foi mostrado em ratos, com a pata posterior imobilizada, que as calpaínas-1 e -2, estão envolvidas no desenvolvimento da atrofia de músculos com a característica predominantemente oxidativa, e que, existe uma diferença nas vias proteolíticas entre os músculos predominantemente lentos e rápidos (VERMAELEN, *et al.*, 2007).

2.2.3 Via proteolítica dependente das Caspases

As caspases constituem um grupo de família de proteases de cisteína (peptidases que usam um resíduo de cisteína como nucleófilo catalítico) com a capacidade para clivar proteínas alvos nos sítios próximos ao resíduo de ácido aspártico. As caspases estão envolvidas na apoptose ou morte celular programada, a qual é essencial para o desenvolvimento embrionário e de muitas patologias (LEEUEWENBURGH, *et al.*, 2005).

A ativação da caspase-3 por meio da conexão entre a via de sinalização da PI3K/Akt e ativação das vias proteolíticas têm importante papel na atrofia muscular induzida por doenças como o câncer e o diabetes (BELIZARIO, *et al.*, 2001, DU, *et al.*, 2004).

Sabe-se que o sistema proteolítico ubiquitina proteassoma é capaz de degradar monômeros de actina ou miosina, no entanto, este sistema não é capaz de quebrar os complexos actomiosina intactos (KANDARIAN; JACKMAN, 2006). Neste sentido, as caspases podem ter ações similares às calpaínas em tornar as proteínas miofibrilares disponíveis para a ubiquitinação (JACKMAN; KANDARIAN, 2004).

Assim, foi mostrado que o tratamento dos complexos de actomiosina solúveis da musculatura esquelética de ratos diabéticos com caspase-3 recombinante, levava a uma acentuada proteólise, entretanto, este efeito foi reduzido após o tratamento com um inibidor de caspase-3 (DU, *et al.*, 2004). Embora estudos prévios tenham buscado investigar e elucidar os mecanismos das caspases, não há evidências mostrando o seu papel na atrofia muscular induzida pelo desuso.

2.2.4 Via Proteolítica dependente do proteassoma

O proteassoma 26S é um grande complexo multiprotéico que consiste do centro proteolítico 20S e de dois “anéis” o 19S, o qual é responsável pela degradação das proteínas ubiquitinadas (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). A degradação da maioria das proteínas miofibrilares decorrente da atrofia ocorre no proteassoma, e o processo de ubiquitinação envolve a cooperativa interação das três enzimas da via conhecidas como E1 ou ativante da ubiquitina, E2 ou conjugante de ubiquitina e a E3 ou ligante de ubiquitina (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002; JACKMAN; KANDARIAN, 2004; KANDARIAN; STEVENSON, 2002). A ubiquitina é primeiramente ativada por meio da ação da E1 num processo dependente de ATP. A ubiquitina ativada é então transferida para a E2, e em seguida a enzima E3, a qual se encontra ligada à proteína substrato a ser marcada e posteriormente degradada, se liga a E2. Neste sentido, a E2 transfere a ubiquitina para a proteína alvo, ligada a E3 marcando-a para posterior degradação no proteassoma. Este processo é repetido várias vezes até que uma cadeia de quatro ou mais moléculas de ubiquitina tenham sido formadas, para que seguidamente a proteína alvo seja degradada em pequenos peptídeos no proteassoma (KANDARIAN; STEVENSON, 2002).

O proteassoma não é capaz de degradar proteínas intactas, e acredita-se que e a quebra de proteínas miofibrilares tanto pelas calpaínas (GOLL, *et al.*, 2003) como pela caspase-3 (DU, *et al.*, 2004) seja um pré-requisito para a ubiquitinação e posterior degradação destas no proteassoma. Assim, no desuso, as caspases e as calpaínas atuam liberando as miofibrilas do sarcômero, e estas entram no processo de ubiquitinação por meio da ação das enzimas E1, E2 e E3, para a posterior degradação no proteassoma (KANDARIAN; STEVENSON, 2002; KANDARIAN; JACKMAN, 2006; JACKMAN; KANDARIAN, 2004; GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002).

Duas proteínas que são comumente utilizadas como marcadores de proteólise da via ubiquitina proteassoma são a MAFbx (*muscle atrophy F-box*), também conhecida como atrogin 1, e a MuRF-1 (*muscle ring finger 1*) (KANDARIAN; STEVENSON, 2002; KANDARIAN; JACKMAN, 2006; JACKMAN; KANDARIAN, 2004). Dois grupos de pesquisa diferentes identificaram simultaneamente uma ligase da proteína ubiquitina que contém um domínio F-box classificando-a com dois nomes diferentes, porém, com a mesma função. Esta proteína é a atrogin-1, o qual é auto-regulado na caquexia (GOMES, *et al.*, 2001), o qual também é conhecida como MAFbx, que é auto-regulada também no desuso (BODINE, *et al.*, 2001). Camundongos knockout da MAFbx submetidos a desnervação, apresentaram uma redução na atrofia do gastrocnêmio em 56% ao décimo quarto dia (BODINE, *et al.*, 2001). Já camundongos *knockout* da MuRF1 apresentaram redução de 36% na atrofia muscular depois de 15 dias de desnervação do gastrocnêmio (BODINE, *et al.*, 2001). Estes efeitos demonstram a importância destas duas proteínas na atrofia muscular, e justifica a importância de utilizá-las como marcadores de atrofia muscular.

2.3 TRANSDUÇÃO DE SINAL E PROTEÓLISE NA ATROFIA MUSCULAR

2.3.1 Relação entre a via da PI3K-Akt e FoxO na Atrofia Muscular

Tem sido demonstrado que a diminuída atividade da via da PI3K/Akt, ativa o fator de transcrição FoxO, no qual resulta no aumento da expressão gênica da atrogin-1/MAFbx, porém, o tratamento com IGF-1 ou aumentada expressão da Akt inibe a expressão da atrogin-1 (EDSTRÖM, *et al.*, 2006). Assim, os fatores de transcrição FoxO têm papel crítico no desenvolvimento da atrofia muscular, e a inibição destes fatores é uma atrativa abordagem para combater o processo de atrofia induzida pelo desuso.

Os fatores de transcrição FoxO (*Forkhead box O*), fazem parte de uma subfamília de um grande grupo de fatores de transcrição "*forkehead*". As células dos mamíferos contêm três membros desta família, Foxo1 (*FKHR*), Foxo3 (*FKHRL1*) e a Foxo4 (*AFX*) (TRAN, *et al.*, 2003). A Akt atenua a função de todos os três fatores de transcrição Foxo por meio da fosforilação em resíduos conservados, mantendo-os no citoplasma (BRUNET, *et al.*, 1999). A Foxo1 está induz a expressão de genes

relacionados com a atrofia, nos quais são chamados de “atrogenes”, e este fator de transcrição, está envolvido em muitos tipos de atrofia muscular (LECKER, *et al.*, 2004).

Camundongos transgênicos hiper-expressando a FoxO1, mostraram decréscimo significativo no tamanho das fibras do tipo I e do tipo II, além de decréscimo no número de fibras do tipo I (KAMEI, *et al.*, 2004). Por outro lado, a atividade de corrida realizada na esteira significativamente reduziu a atividade da FoxO1, nos indivíduos transgênicos em comparação aos controles (KAMEI, *et al.*, 2004).

Verificou-se que humanos com doença pulmonar obstrutiva crônica, com a musculatura esquelética tanto em atrofia quanto normal, as concentrações das proteínas FoxO1, Akt e 4E-BP1 estavam aumentadas (DOUCET, *et al.*, 2007). Em adição, as concentrações do RNAm das ubiquitinas ligases atrogin-1 e MuRF1 também estavam aumentadas em sujeitos com atrofia em comparação aos sujeitos controle (DOUCET, *et al.*, 2007). Diante disto, foi sugerido que a regulação transcricional das ubiquitinas ligases ocorrem via FoxO1, porém, nem sempre são dependentes da Akt, demonstrando que, ao menos nestes indivíduos, parece existir um aumento na expressão das vias de sinalização hipertróficas na tentativa de restaurar massa muscular perdida (DOUCET, *et al.*, 2007).

Além do papel da Foxo1 na atrofia muscular, a Foxo3, é um fator de transcrição bem caracterizado na atrofia muscular. Em músculos atrofiados devido ao jejum, diabetes, uremia ou câncer, os níveis do RNAm da Foxo1 e da Foxo3 aumentam (FURUYAMA, *et al.*, 2003; LECKER, *et al.*, 2004). Além do mais, tem sido demonstrado que a forma constitutivamente ativa da Foxo3 age no promotor da atrogin-1, causando uma severa atrofia tanto em miotúbulos como em fibras musculares (SANDRI, *et al.*, 2004). Estes estudos demonstram que os fatores de transcrição Foxo têm importante papel na atrofia muscular, e que a sua inibição é uma atrativa abordagem para combater a atrofia muscular.

2.3.2 NF-kB como Molécula de Sinalização na Atrofia Muscular

O fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-kB) é um complexo protéico o qual foi mostrado estar envolvido no processo de atrofia muscular induzida pelo desuso. Em mamíferos, existem cinco subunidades diferentes de NF-kB (p65 ou Rel

A, Rel B, c-Rel, p52 e a p50), os quais medeiam uma variedade de processos de acordo com o tipo de célula e dos ativadores específicos (KANDARIAN ; JACKMAN, 2006).

A ativação do NF- κ B se dá por meio da ubiquitinação e degradação de sua proteína inibitória I κ B, que em estado normal encontra-se ligada ao NF- κ B mantendo-o no citoplasma (KANDARIAN; JACKMAN, 2006). Por exemplo, na via clássica ou canônica, o TNF α ativa a fosforilação de uma quinase do I κ B, a IKK β , que por sua vez estimula a degradação do I κ B, permitindo a translocação do heterodímero p65/p50 para o núcleo, porém, quando o I κ B é ativado pelo IKK α , a via de ativação é a não-canônica do NF- κ B (KANDARIAN; JACKMAN, 2006). Foi relatado que sete dias de suspensão da pata posterior de ratos, marcadamente auto-regulou os níveis nucleares da p50, enquanto a c-Rel foi moderadamente auto-regulada, a Rel B baixo-regulada, e a p52 e p65 não sofreram mudanças (HUNTER, *et al.*, 2002). Foi verificado também que durante este período, os membros da família do NF- κ B ativados pelo desuso são completamente diferentes dos membros ativados pela caquexia (HUNTER, *et al.*, 2002). Outro fato que vale ressaltar é que as concentrações da proteína anti-apoptótica Bcl-2 estavam aumentadas em quatro vezes, enquanto que às das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak estavam reduzidas (HUNTER, *et al.*, 2002).

Período de três a sete dias de suspensão da pata posterior é capaz de ativar genes envolvidos na atrofia como a atrogin-1, FoxO3a entre outros, os quais parecem ser alvos dos fatores de transcrição NF- κ B (JUDGE, *et al.*, 2007). Neste sentido, a degradação do I κ B α é um fator necessário para atrofia induzida pelo desuso, por meio do aumento na ubiquitinação da proteína I κ B e ativação da via de sinalização do NF- κ B e a expressão de genes alvos envolvidos na atrofia muscular (JUDGE, *et al.*, 2007). Porém, é possível que a ativação das vias de sinalização canônica e não-canônica do NF- κ B na atrofia muscular induzida pelo desuso sejam ativadas de forma tempo dependente, pois o NF- κ B é ativado bifasicamente na musculatura esquelética de ratos tanto jovens como idosos durante quatro semanas de imobilização, com decréscimo na atividade da via clássica do heterodímero p65/p50 nas primeiras duas semanas, seguido por aumento na atividade deste heterodímero nas próximas duas semanas (BAR-SHAI, *et al.*, 2005). Estes achados são consistentes com os publicados previamente, os quais mostraram ativação da via alternativa do NF- κ B seguindo a atrofia por desuso (HUNTER, *et al.*, 2002;

JUDGE, *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou existir uma quinase específica da musculatura esquelética acima do NF- κ B, na qual exerce a mesma função que a proteína quinase- β do IKK (CAI, *et al.*, 2004). Esta proteína quinase foi chamada pelos autores de MIKK, por ser específica da musculatura esquelética, e esta quinase demonstrou causar intensa proteólise (CAI, *et al.*, 2004). Foi verificada uma elevada perda de massa muscular através do sistema ubiquitina proteassoma, pois a expressão da ubiquitina ligase MuRF1, estava aumentada em ratos com a forma constitutivamente ativa da MIKK (CAI, *et al.*, 2004). Além do mais, a inibição farmacológica do eixo IKK β /NF- κ B/MuRF1 reverteu a atrofia, levando a uma atenuada proteólise induzida pela desnervação ou pelo tumor, permitindo uma maior taxa de sobrevivência (CAI, *et al.*, 2004). Neste sentido, a sinalização do NF- κ B é componente central do processo de atrofia e pode estar envolvida na ativação dos processos proteolíticos. A partir destes achados, pode-se sugerir que em músculos atrofiados pela imobilização, o NF- κ B é ativado, levando a uma maior transcrição de genes envolvidos com a atrofia muscular.

2.4 EFEITOS METABÓLICOS DA ATROFIA MUSCULAR PELO DESUSO

Em resposta ao diminuído uso, a musculatura esquelética sofre um remodelamento redutivo adaptativo (STEIN; WADE, 2005). Estudos com modelos de repouso (*bed rest*), em humanos, num período de 3-4 meses, mostraram atrofia de aproximadamente 30% nos músculos da perna, valores que são cerca de 10-15% maior do que é relatado nos músculos da coxa (ALKNER; TESCH, 2004; LEBLANC, *et al.*, 1992; SHACKELFORD, *et al.*, 2004). Como parte deste processo de remodelamento, existe também mudança na isoforma da cadeia pesada de miosina de um fenótipo lento para um fenótipo rápido (FITTS, RILEY, WIDRICK, 2000). As mudanças na fisiologia e estrutura muscular com desuso apresentam maiores quantidades de estudos. Porém, pouco se sabe sobre as consequências metabólicas associadas com a atrofia induzida pelo desuso.

2.4.1 Efeitos da Atrofia Muscular Induzida pelo Desuso sobre a Sinalização da Insulina

A via de sinalização da insulina na musculatura esquelética é controlada por uma série de eventos de fosforilação que ligam à ativação inicial de receptor de insulina e os substratos abaixo do receptor, que em última instância, levará a translocação do transportador 4 de glucose (GLUT4) para membrana plasmática, seguido de sua incorporação à membrana e subsequente captação de glucose (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006). Foi relatado que a imobilização da pata posterior de ratos machos adultos da linhagem Sprague-Dawley, reduz a fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina (IR- β) e do substrato para o receptor de insulina-1 (IRS-1) e isto foi acompanhada por diminuída ligação do IRS-1 a subunidade regulatória p85 da proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) e do IRS-1 associado a PI3K (HIROSE, *et al.*, 2000). Assim, um prolongado período de imobilização pode deprimir o transporte de glucose estimulado pela insulina na musculatura esquelética por alterar a ação da insulina em múltiplos pontos, incluindo fosforilação em tirosina, expressão de proteínas e ativação de componentes essenciais da via de sinalização da insulina (HIROSE, *et al.*, 2000). Neste sentido, a imobilização além de deprimir o transporte de glucose induzido pela insulina na musculatura esquelética, também leva a um estado catabólico nas áreas afetadas e, isto pode resultar em um músculo cada vez mais debilitado.

2.5 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas tanto na musculatura inativa, causada pelo desuso, como nos músculos ativos induzido pelo treinamento (POWERS, VAVAZIS, MCCLUNG, 2007; REID, 2001). Quando a produção de espécies reativas de oxigênio excedem a sua capacidade anti-oxidante para eliminar estes oxidantes, o estresse oxidativo ocorre. O estado pró-oxidante na célula pode alterar a estrutura e função das proteínas e ácidos nucleicos, resultando em lesão celular e em circunstâncias extremas, morte celular (POWERS, VAVAZIS, MCCLUNG, 2007). Estudos iniciais mostraram que a atrofia induzida por imobilização da musculatura esquelética estava associada com a aumentada

produção de radicais livres de oxigênio, resultando em lesão oxidativa nas fibras musculares inativas (KONDO, *et al.*, 1992; KONDO, NISHINO, ITOKAWA, 1994).

Tem sido demonstrado que a proteína quinase de RNA de dupla fita (PKR), está envolvida na formação EROS induzida pelo fator de necrose tumoral alfa e pela angiotensina II em miotúbulos de camundongos (ELEY, *et al.*, 2008). A formação de EROS, por sua vez, parece ser o mecanismo chave da atrofia muscular induzida pelo desuso (POWERS, VAVAZIS, MCCLUNG, 2007). Interessantemente, em linhagens de células C2C12 em atrofia quando expostas ao metabólito do aminoácido essencial leucina, β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), verifica-se que este tem a capacidade de atenuar a ativação da PKR (ELEY, *et al.*, 2008), e conseqüentemente, a formação de EROS. Neste sentido, se o HMB atenuar a ativação da PKR e conseqüentemente a formação de EROS, ele poderia atenuar a atrofia muscular em músculos que são submetidos a um procedimento que resulte em atrofia. Diante disto, a mensuração do estado oxidativo da musculatura esquelética imobilizada pode ser uma medida atrativa no estudo atual, pois se a suplementação com HMB atenuar a atrofia muscular, esta poderia também de alguma forma atenuar o aumento na produção de EROS.

2.5.1 O Estresse Oxidativo Ativa a Sinalização pela MAPK

A regulação redox das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) apresenta papel crucial que liga o estresse oxidativo e a atrofia na musculatura esquelética. As MAPKs controlam numerosos mecanismos de sinalização celular devido ao controle de numerosas vias de sinalização por meio da ativação e desativação de proteínas regulatórias através da fosforilação (CUSCHIERI, MAIER, 2005). Estas proteínas quinases contribuem para a regulação de decisões de vida ou morte celular em respostas a vários sinais de estresse (i.e. estresse oxidativo), com ações sobre os fatores tanto pró como anti-apoptóticos (MATSUZAWA, ICHIJO, 2005). As células eucarióticas possuem múltiplas vias MAPKs, dentre as mais bem caracterizadas estão as famílias das quinases c-Jun NH₂-terminal (JNK), p38 MAPK, e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (CUSCHIERI, MAIER, 2005). Todas são estruturalmente similares, mas funcionalmente distintas, e além do mais, todas são ativadas pelo estresse oxidativo e podem potencialmente participar das vias que influenciam na proteólise e apoptose (POWERS, VAVAZIS, MCCLUNG,

2007). A ativação da cascata clássica da MAPK consiste da ativação seqüencial de três passos de ativação da proteína quinase intracelular, o que leva a ativação de numerosas proteínas quinases, proteínas nucleares e fatores de transcrição, resultando em sinais de transdução posteriores (CUSCHIERI, MAIER, 2005; PEARSON, et al., 2001).

2.5.2 Ativação da Via de Sinalização Dependente da ERK no Estresse Oxidativo

A primeira e melhor estudada cascata de sinalização MAPK é a via da ERK (CUSCHIERI, MAIER, 2005; PEARSON, *et al.*, 2001). A ERK é composta de três isoformas, sendo a ERK1 e ERK2 as mais referidas, e comumente referidas como ERK1/2 (CUSCHIERI, MAIER, 2005). A ERK1/2 pode ser ativada por muitos mitógenos, incluindo o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante (TGF) e pela insulina. Além do mais, a ERK1/2 pode ser ativada pela endotoxina e pelo estresse oxidativo (CUSCHIERI, MAIER, 2005). A ativação da ERK1/2 pelo estresse oxidativo é consistente com a hipótese de que baixa e adequada concentração de espécies reativas de oxigênio são mitogênicas (PEARSON, *et al.*, 2001; QUI ; ELION, 2005). A ativação da ERK1/2 regula a atividade transcricional da AP-1, NF-kB, c-Myc e a sobrevivência celular através da ativação da Bcl-2 (QUI ; ELION, 2005). Embora tenha sido relatado que a ERK1/2 possa promover apoptose, a ERK1/2 também pode funcionar como fator anti-apoptótico que acompanha o estresse oxidativo (PEARSON, *et al.*, 2001). Até agora há poucas evidências que ligam a ativação da ERK1/2 com a atrofia induzida pelo desuso (POWERS, VAVAZIS, MCCLUNG, 2007).

2.5.3 Regulação Redox da Sinalização do NF-kB

Outra ligação potencial entre o estresse oxidativo e a atrofia por desuso envolve a regulação da família de ativadores transcricionais do NF-kB. Desde a sua descoberta, tem-se acumulado evidências que indicam que uma via específica é necessária para ativação do NF-kB na atrofia por desuso (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; KANDARIAN; JACKMAN, 2006). Embora, o NF-kB regule a expressão de

mais uma centena de genes, um detalhado entendimento dos específicos alvos necessários para a atrofia por desuso permanece incompleto. Tem sido demonstrado que as espécies reativas de oxigênio ativam vias de transdução de sinais por meio da ativação de quinases que promovem a ativação do NF- κ B citoplasmático e a sua translocação para o núcleo (KABE, *et al.*, 2005; PANTANO, *et al.*, 2006). O NF- κ B é considerado um fator de transcrição pró-apoptótico e, as espécies oxidativas de oxigênio podem tanto promover como inibir a ativação transcricional do NF- κ B (PANTANO, *et al.*, 2006).

2.6 MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES QUE REGULAM A SÍNTESE PROTÉICA

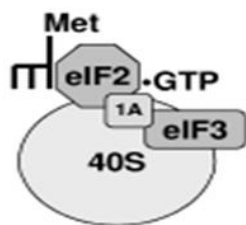
A regulação da síntese protéica nos tecidos dos mamíferos ocorre principalmente pela modulação de dois passos chave de uma via complexa, sendo que ambos os passos estão envolvidos na fase de iniciação da tradução (STIPANUK, 2007).

2.6.1 Passo 1: Formação do Complexo de Pré-iniciação 43S Dependente do eIF2

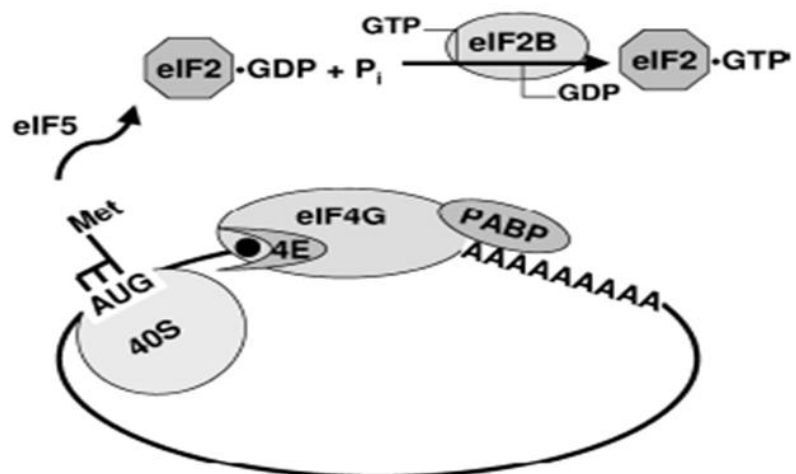
Um dos passos regulado na iniciação da tradução, consiste na ligação do aminoácido metionina de um ácido ribonucléico transportador (tRNA) iniciador específico (Met-tRNA_i) à subunidade ribossomal 40S para formar o complexo de pré-iniciação 43S (figura 1a) (STIPANUK, 2007). Este passo é mediado pelo fator de iniciação eucariótico-2 (eIF2), o qual é uma proteína ligadora de trifosfato de guanosina (GTP) heterotrimérica. No estado ligado ao GTP, o eIF2 interage com o Met-tRNA_i para formar um complexo ternário eIF2-GTP/Met-tRNA_i, no qual em associação com outros fatores de iniciação, se liga à subunidade ribossomal 40S (STIPANUK, 2007). O complexo resultante 40S/Met-tRNA_i/eIF2-GTP, então se liga ao RNAm próximo a estrutura “Cap” pela interação de um domínio central do fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) com o eIF3 (veja a figura 2b e subsequente o texto) (STIPANUK, 2007). A proteína quinase do fator de iniciação eucariótico-2 (eIF2k) exerce efeito controlador sobre a reciclagem do eIF2-GDP (figura 1c). Após o perfeito engajamento do Met-tRNA_i com o códon inicial

(códon AUG), o GTP é hidrolisado a GDP e P_i , num processo que envolve o eIF5 (uma proteína ativadora GTPase), e o complexo eIF2-GDP sai do ribossomo (figura 1b). Para o eIF2 ser usado novamente para formar um novo complexo ternário, o eIF2-GDP deve ser reciclado novamente para a sua forma ativa ligada ao GTP. Isto é mediado pelo eIF2B, um fator de troca de guanina nucleotídeo para o eIF2 (STIPANUK, 2007). O processo completo de ligação do Met-tRNAi é regulado pela fosforilação da subunidade alfa do eIF2 (eIF2 α) por uma das quatro cinases do eIF2 dos mamíferos, a qual é ativada sobre condições de estresse específico (STIPANUK, 2007). Uma das quatro cinases do eIF2, o GCN2 (*general control nonderepressible 2*) é ativada pela falta de um ou mais aminoácidos essenciais (STIPANUK, 2007). A leucina por ser um aminoácido essencial tem importante feito sobre estes processos, neste sentido, o seu metabólito, o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), também pode ter efeito sobre estes mecanismos, e assim contribuir para o crescimento celular quando a célula é sobrecarregada com estímulos específicos ou atenuar a atrofia muscular.

A. Formação do complexo de pré-iniciação 43S



B. Liberação e reutilização do eIF2-GTP



C. Regulação da reutilização do eIF2-GTP pela fosforilação do eIF2

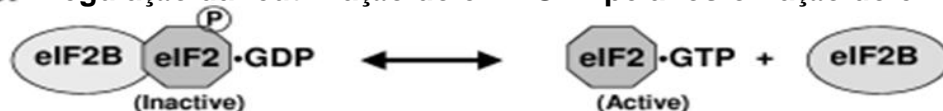


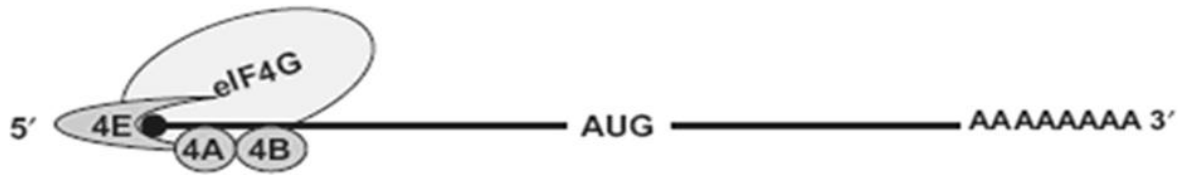
FIGURA 1 – Passo 1 da fase de iniciação da tradução de RNAm eucariótico. Formação do complexo de pré-iniciação, (B) liberação e reciclagem do eIF2-GDP por meio da associação Met-tRNAi com o códon inicial, (C) regulação da reciclagem do eIF2-GDP pela fosforilação do eIF2. 40S: subunidade ribossomal; eIF: fator de

iniciação eucariótica; GDP/GTP: guanosina di- ou trifosfato; PABP: proteína de ligação da cauda poli-A (adaptado de STIPANUK, 2007).

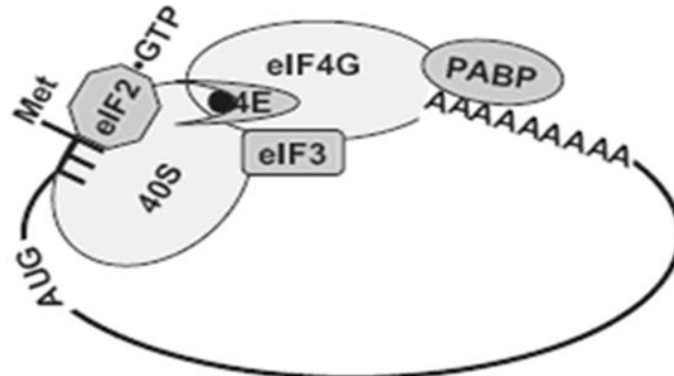
2.6.2 Passo 2: Reconhecimento da Estrutura m^7GTP RNAm “Cap” dependente do eIF4

O segundo passo regulado na iniciação da tradução envolve o reconhecimento da estrutura *cap* e a formação de um sítio de ligação no ribossomo ou seleção de um sítio de iniciação da tradução (figura 2a). Este passo é mediado por um complexo heterotrimérico de fatores de iniciação eucarióticos referidos como eIF4F. As três subunidades do eIF4F são eIF4A, eIF4E e eIF4G (STIPANUK, 2007). O evento alvo para a seleção do sítio de iniciação da tradução é a ligação da subunidade eIF4E do eIF4F com a estrutura 7 metil guanosina trifosfato (m^7GTP)-*cap* presente na extremidade 5' dos RNAs eucarióticos. A subunidade eIF4A, é uma RNA-helicase ATP-dependente, que libera uma estrutura secundária na região não-traduzida do RNAm, para facilitar a ligação da pequena subunidade ribossomal (STIPANUK, 2007). Como mostram as figura 2c e figura 3, o eIF4G, é uma proteína grande com múltiplos domínios, que medeia uma série de interações entre proteína-proteína que culminam no recrutamento do complexo de pré-iniciação 43S a extremidade 5' do RNAm (STIPANUK, 2007).

- A. Reconhecimento eIF4E-dependente da estrutura cap m^7GTP do RNAm e formação de um sítio de ligação no ribossomo.



- B. Ligação do complexo ribossomal 43S (pré-iniciação).



- C. Regulação da disponibilidade do eIF4E pela fosforilação do 4E-BP1.



FIGURA 2 – Passo 2 da via de iniciação da tradução do RNAm eucariótico. Reconhecimento da estrutura cap m^7GTP do RNAm, dependente do eIF4E e formação de um sítio de ligação ribossômico, (B) ligação do complexo de pré-iniciação (43S), (C) regulação da disponibilidade do eIF4E para o reconhecimento da estrutura cap por uma proteína de ligação do eIF4E, a 4E-BP1. 4E-BP1: proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E; eIF: fator de iniciação eucariótico; 40S: subunidade ribossomal; PABP: proteína de ligação da cauda poli-A (adaptado de STIPANUK, 2007).

Além de se ligar às subunidades eIF4E e eIF4A do complexo eIF4F, o eIF4G também atua como proteína de arcabouço que recruta o eIF3 ligado à subunidade ribossomal 40S, num complexo 40S/Met-tRNAi/eIF2-GTP descrito no passo 1. O eIF4G também se liga à proteína de ligação da cauda poli-(A), PABP, permitindo uma circularização do RNAm, o qual pode permitir uma mais eficiente iniciação da tradução (STIPANUK, 2007).

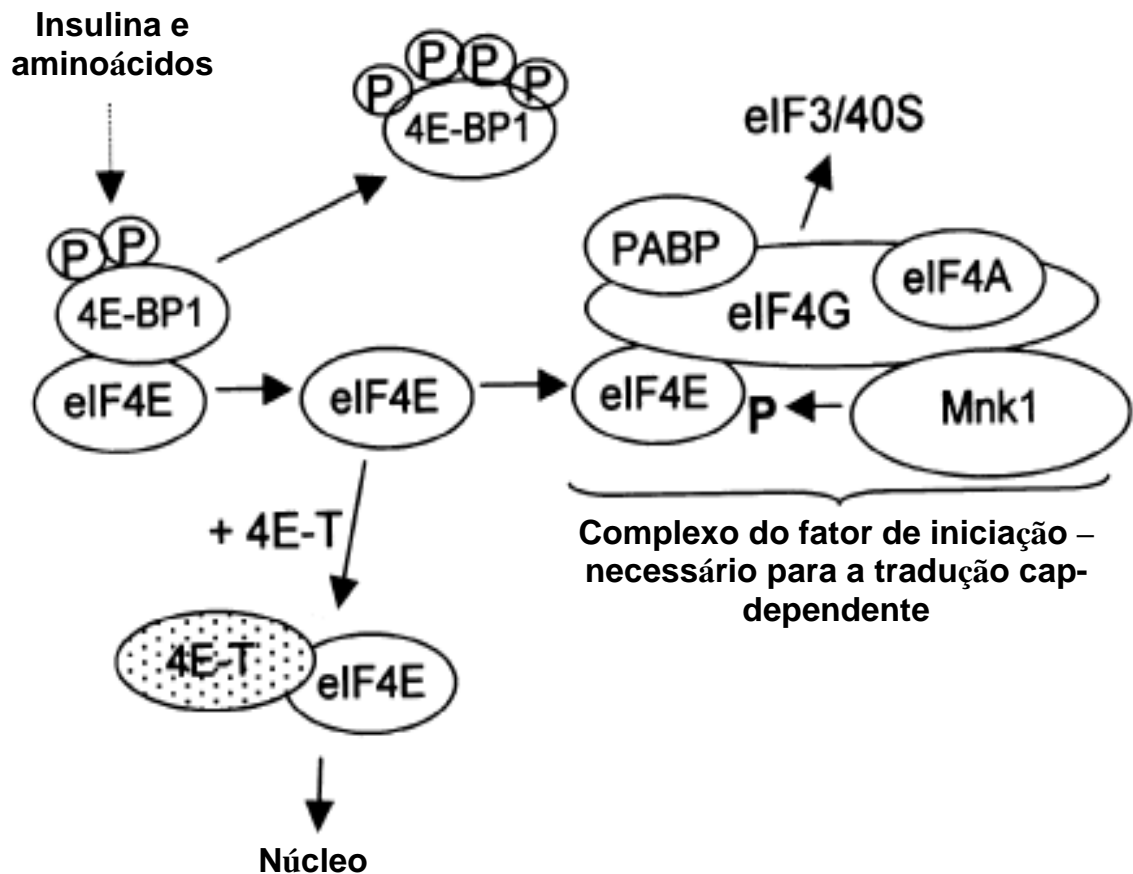


FIGURA 3 – Estrutura esquemática e regulação do eIF4E e 4E-BP1. A insulina e os aminoácidos estimulam a fosforilação da 4E-BP1, a qual se encontra ligada ao eIF4E. A fosforilação da 4E-BP1, libera a eIF4E para formar o complexo eIF4F, o qual posteriormente formará o complexo de pré-iniciação. 4E-BP1: proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4; eIF4E: fator de iniciação eucariótico 4E; eIF3: fator de iniciação eucariótico 3; 40S: subunidade ribossomal 40S; PABP; proteína de ligação da cauda poli-A (adaptado de PROUD, 2002).

2.6.3 Formação do Complexo eIF4F Fosforilação-dependente

Mudanças nas disponibilidades do eIF4E para formar o complexo ativo eIF4E-eIF4G ocorrem através da associação do eIF4E com a 4E-BP1. A ligação do eIF4E a 4E-BP1 é regulada pela fosforilação da 4E-BP1 (figuras 2c e 3). No seu estado hipofosforilado a 4E-BP1 se liga firmemente ao eIF4E. Pelo fato das 4E-BPs se ligarem aos mesmos sítios do eIF4E, como faz o eIF4G, a associação da 4E-BP1 com o eIF4E bloqueia a disponibilidade de eIF4E em se ligar ao eIF4G, para formar o complexo ativo (STIPANUK, 2007). A fosforilação da 4E-BP em múltiplos resíduos

tem importante função sobre a síntese protéica, por favorecer a formação do complexo traducional ativo, o eIF4F (STIPANUK, 2007). Da mesma forma que foi exemplificada acima, a figura 4 resume os passos da iniciação da tradução em um modelo esquemático único:

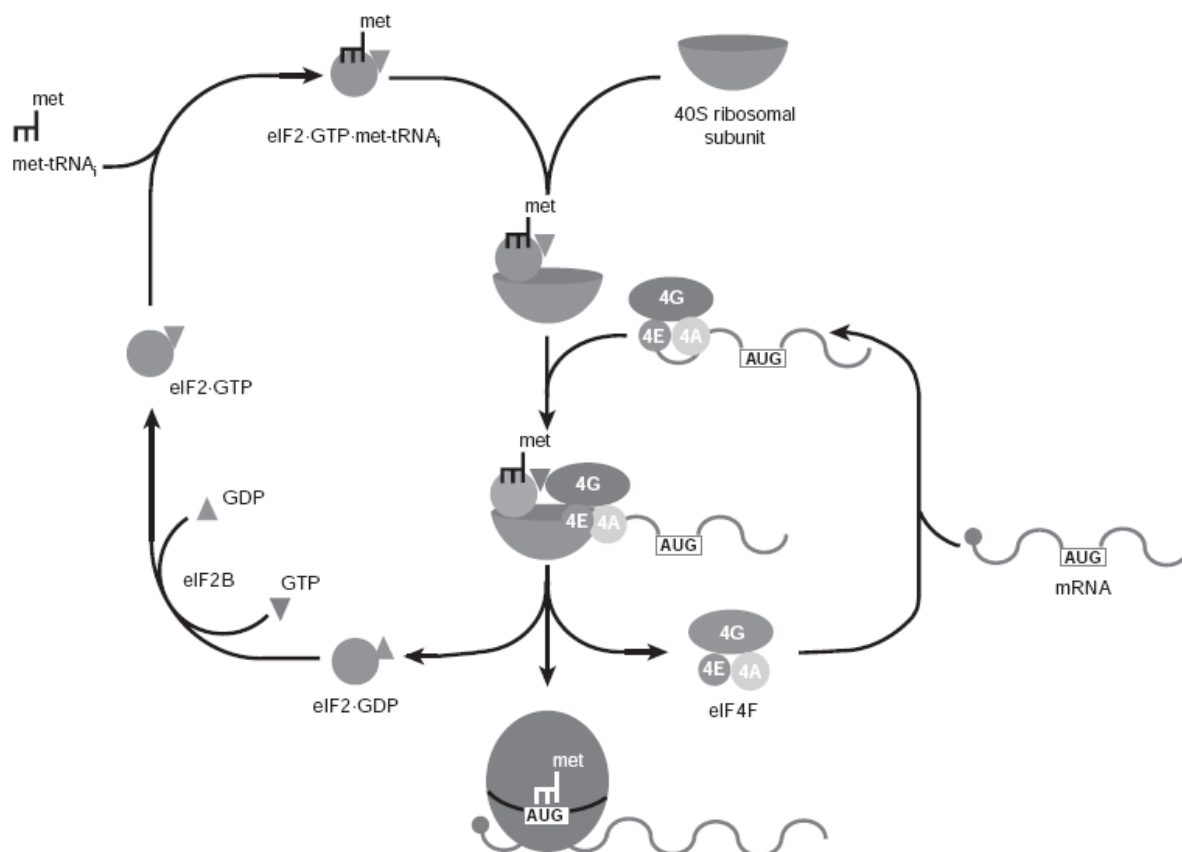


FIGURA 4 – Via de iniciação da tradução nas células dos mamíferos. Ligação do Met-tRNAi (lado esquerdo da figura) e o passo de ligação do RNAm (lado direito da figura) na iniciação da tradução. Os vários fatores de iniciação de tradução eucarióticos (eIFs) e seus papéis na tradução do RNAm estão descritos em detalhes no texto. No esquema, a tradução do RNAm inicia com a ligação do Met-tRNAi à subunidade ribossomal 40S numa reação mediada pelo eIF2. A ligação do RNAm à subunidade ribossomal 40S ocorre através da interação da subunidade do eIF4E com a estrutura m⁷GTP *cap* na extremidade 5' do RNAm e a associação do eIF4G com a subunidade ribossomal 40S por meio do eIF3, o qual não aparece no esquema. A iniciação finaliza quando o complexo de iniciação localiza o códon de início AUG com a subsequente união da subunidade ribossomal 60S com a 40S e a formação do ribossomo completo 80S. Neste ponto, os fatores de iniciação são liberados do complexo (KIMBALL; JEFFERSON, 2001).

2.7 ADAPTAÇÃO DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA A AUMENTADA SOBRECARGA

Existem evidências mostrando que os efeitos mitogênicos e miogênicos do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) sobre a musculatura esquelética são essenciais para a regeneração e adaptação muscular a sobrecarga aumentada (ADAMS, 2002). Assim, a sobrecarga aumentada, o alongamento e as ações musculares excêntricas resultam em aumentada expressão e conteúdo do RNAm do IGF-1 (ADAMS, 2002).

O IGF-1 ao se ligar ao seu receptor de membrana plasmática (IGF-R1) inicia uma série de cascata de sinalização. Uma via ativada pelo IGF-1 envolve a sinalização da Ras-Raf até as ERKs, nos quais podem ativar inúmeros fatores de transcrição assim como outras proteínas quinases. Estudos utilizando células musculares, em cultura, mostraram que esta via promove elevada proliferação celular (COOLICAN, *et al.*, 1997).

A outra via de sinalização ativada pelo IGF-1 envolve a fosforilação do substrato receptor de insulina, e isto leva a ativação da PI3K, e esta proteína é central para inúmeros processos celulares incluindo proteção contra apoptose, aumentada tradução e alterações das concentrações de cálcio intracelular (figura 5). A PI3K leva a ativação de várias proteínas intracelulares, tais como a 4E-BP1 e a p70^{S6K} (ADAMS, 2002). Contudo, a ativação da proteína p70^{S6K} é de particular interesse, pois esta aumenta a tradução de RNAs que codificam proteínas ribossomais e fatores de alongação, nos quais são componentes integrais da maquinaria de síntese protéica (THOMAS; HALL, 1997).

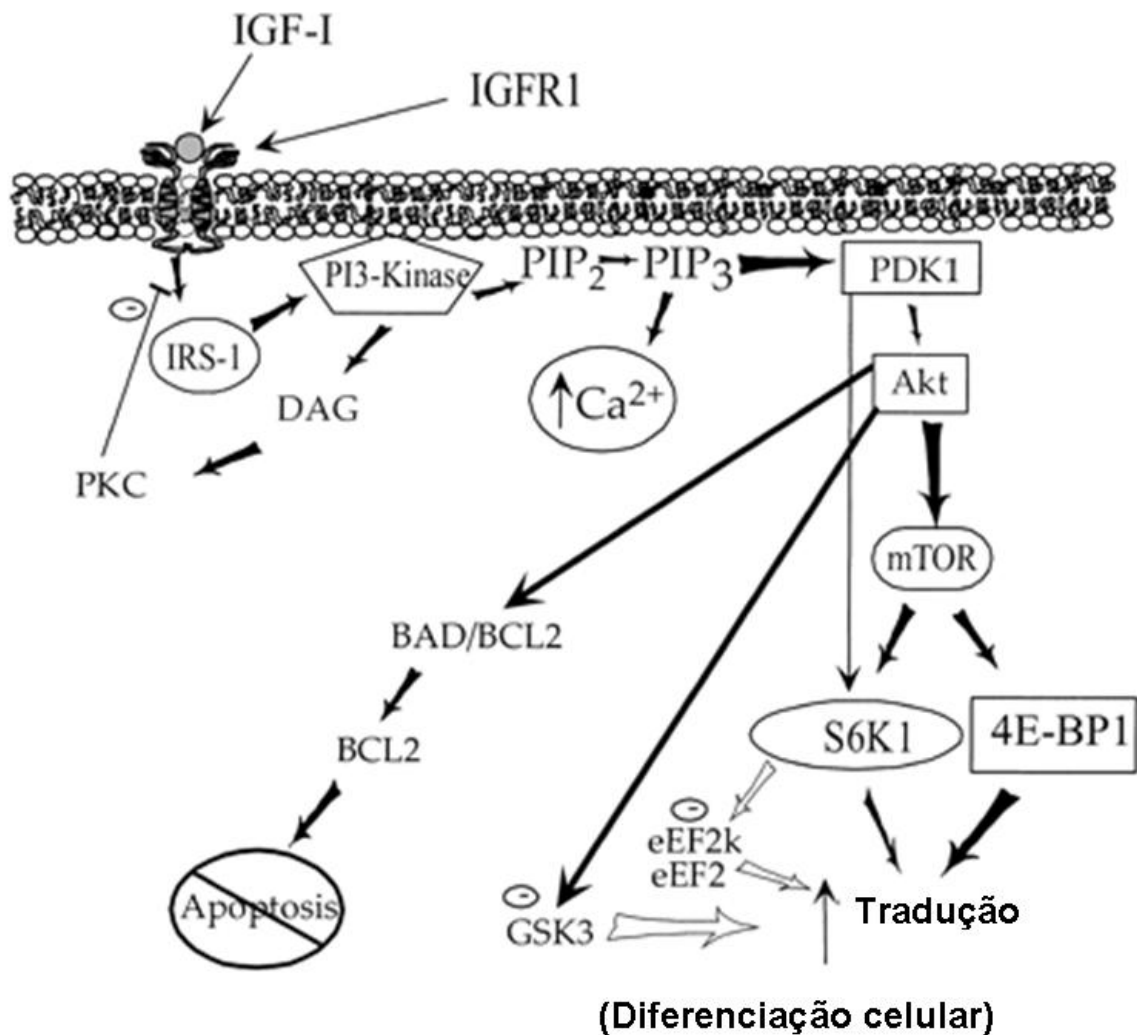


FIGURA 5 – Cascata de sinalização ativada pelo IGF-1/PI3K/Akt. A ligação do IGF-1 ao seu receptor de membrana, leva ao recrutamento do IRS-1, seguido de uma ativação da PI3k. A proteína PI3k estimulará o recrutamento da Akt para a membrana plasmática, para que a mesma seja fosforilada. A Akt fosforila a mTOR, a qual está envolvida na síntese protéica e inibe a apoptose. Akt: proteína quinase B; Bcl-2: “*B- cell linfoma 2*”; BAD: “*Bcl-2- associated death promoter*”; DAG: diacilglicerol; GSK3: glicogênio sintase quinase; IGF-1: fator de crescimento semelhante a insulina 1; IGF-1R: receptor de IGF-1; IRS-1: substrato do receptor de insulina 1; mTOR: alvo da rapamicina de mamíferos; PI3k: fosfatidilinositol 3 quinase; PIP₂: fosfoinositol 3, 4, bifosfato; PIP₃: fosfoinositol 3, 4, 5, trifosfato (adaptado de ADAMS, 2002).

2.8 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA

2.8.1 Efeitos sobre a Síntese Protéica através da Suplementação com Leucina

Vários estudos mostram que a leucina regula a síntese protéica na musculatura esquelética independente das mudanças na formação do complexo ternário, pois a leucina parece não alterar a atividade do eIF2B (fator de troca de guanina nucleotídeo para o eIF2) nem o estado de fosforilação do eIF2 α , porém a leucina aumenta a associação do eIF4E com o eIF4G (ANTHONY, *et al.*, 2000). A leucina estimula a síntese protéica em diferentes células e tecidos como: fígado, musculatura esquelética, tecido adiposo (quando avaliado pela fosforilação da S6K1, S6 e da 4E-BP1), e estes efeitos parecem estar ligados com a sinalização do mTOR (alvo sensível à rapamicina) (ANTHONY, *et al.*, 2000; LYNCH, *et al.*, 2002; CROZIER, *et al.*, 2005). A leucina estimula síntese protéica por meio do aumento da formação do complexo ativo eIF4F (figura 6), e isto é independente dos aumentos nas concentrações séricas de insulina (ANTHONY, *et al.*, 2001). Porém, concentrações basais são importantes para maximizar os efeitos da leucina sobre a síntese protéica (STIPANUK, 2007), pois a insulina exerce efeito permissivo sobre a síntese protéica estimulado pela leucina (ANTHONY, *et al.*, 2002).

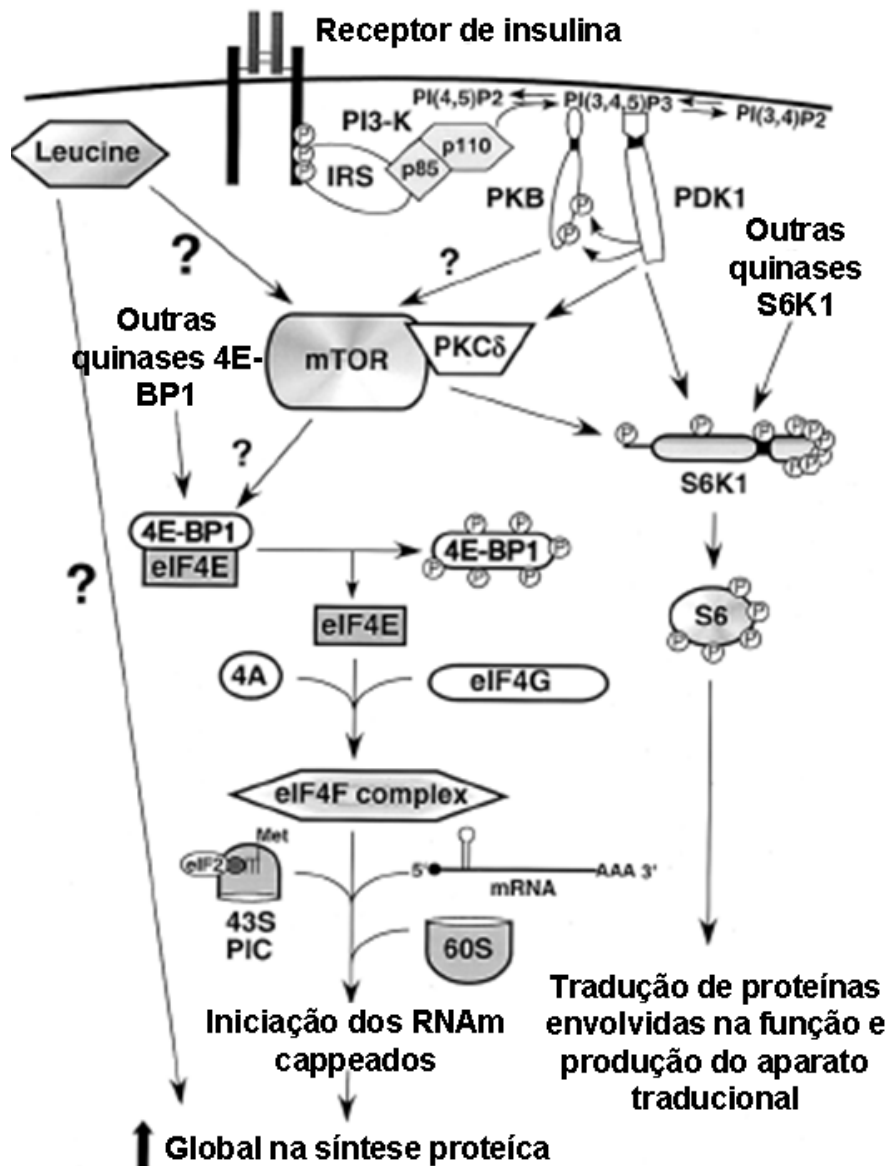


FIGURA 6 – Eventos de sinalização na estimulação na iniciação da tradução pela leucina. A leucina de maneira ainda não esclarecida estimula a fosforilação e ativação da mTOR a qual irá fosforilar alvos abaixo. A mTOR fosforila a 4E-BP1, o qual irá liberar o eIF4E para formar o complexo eIF4F, e mediar os mecanismos que estão envolvidos com a síntese protéica. Além do mais, a mTOR fosforila a S6K1, a qual está envolvida na tradução de proteínas ribossomais. PKB: proteína quinase B; eIF: fator de iniciação eucariótico; IRS-1: substrato do receptor de insulina 1; PI3K: fosfatidilinositol 3 quinase; PDK1: proteína quinase dependente de fosfoinositol (adaptado de ANTHONY, *et al.*, 2001).

2.8.2 Efeitos anti-proteolítico através da Suplementação com Leucina

Os efeitos anti-proteolítico da suplementação com leucina tem sido relatado há muito tempo (BUSE; REID, 1975). Em geral, a suplementação com leucina diminui a proteólise muscular esquelética quando infundida intravenosamente (LOUARD, BARRETT, GELFAND, 1995), quando um músculo está intacto (BUSE; REID, 1975, TISCHLER, DESAUTELS, GOLDBERG, 1982; MITCH; CLARK, 1984) ou quando células musculares (NAKASHIMA, *et al.*, 2005) são incubadas na presença de leucina, ou quando há sua ingestão oralmente (COMBARET, *et al.*, 2005). Contudo, a magnitude da inibição é diferente de acordo com a espécie, condição patológica, e especificamente, com o modelo de atrofia (ZANCHI, NICASTRO, LANCHI JR, 2008).

Em estudos crônicos, a eficácia da suplementação com leucina não é bem demonstrada como ocorre em estudos agudos, porém, este nível de suplementação ainda mostra importante efeito anti-proteolítico (ZANCHI, NICASTRO, LANCHI JR, 2008).

Com a utilização de inibidores da transaminação da leucina, ocorre interrupção da capacidade deste aminoácido em inibir o catabolismo protéico, contudo, o efeito sobre a síntese não é modificado. Isto sugeriu fortemente que o efeito da leucina em atenuar a degradação protéica seja decorrente de algum metabólito da leucina. Um metabólito candidato ao efeito anti-proteolítico da leucina é o HMB ao lado do α -ceto-isocaproato (CIC ou KIC) (OSTASZEWSKI, *et al.*, 2000; SMITH, MUKERJI, TISDALE, 2005). Estudos que realizaram a incubação de músculos de aves e de ratos na presença de HMB encontraram elevação da síntese protéica em 20% e redução do catabolismo protéico em 80% (OSTASZEWSKI, *et al.*, 2000). Além do mais, parece que em situações de estresse, tanto humanos como animais não sintetizam HMB na quantidade necessária para suprir a demanda tecidual (NISSEN & ABUMRAD, 1997). Isto justifica a necessidade em se realizar suplementação com este metabólito em situações de estresse, como na atrofia por desuso, com o intuito de atenuar a proteólise muscular esquelética.

2.8.3 Metabolismo da Leucina e Produção de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB)

A leucina é um aminoácido essencial de cadeia ramificada, encontrado em muitas fontes protéicas da dieta, e é considerada de vital importância para a construção de proteínas e para o funcionamento normal de vários tecidos (CALDER, 2006). Grande parte da leucina metabolizada, em mamíferos, por uma via metabólica característica possui entre seus produtos o acetoacetato e o acetil-CoA (figura 7). Estes produtos são originados após a seqüência de seis reações catalisadas por enzimas, que iniciam pela transferência do grupamento amino da leucina para o α -cetoglutarato formando glutamato. Para que ocorra a completa oxidação da leucina por esta via é necessária: tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina, pantotenato, biotina, ubiquinona e o ácido lipóico, em quantidades ideais.

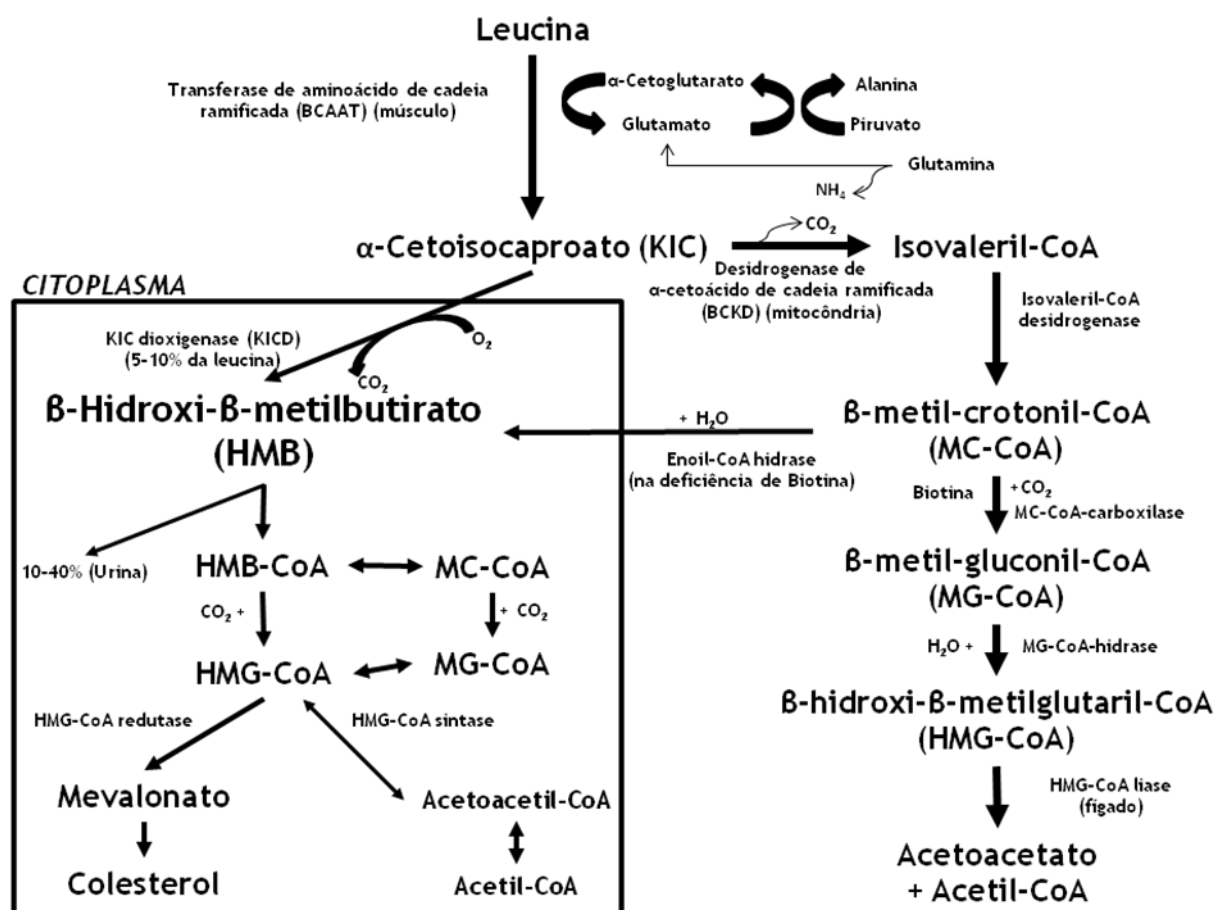


FIGURA 7 – Visão geral do metabolismo da leucina, α -cetoisocaproato e do HMB. Detalhes da via está descrita no texto (adaptado de DRISKELL, 2007).

Em menor proporção, parte da leucina (5-10%) é oxidada levando a produção de HMB. Uma terceira via de metabolização da leucina, conhecida como via β -ceto, acontece principalmente nos testículos (células de Sertoli), e no pâncreas. Contudo, na maioria dos outros tecidos, a oxidação da leucina conta com menos de 5% da metabolização da leucina disponível. A principal característica desta via é que ela possui sua primeira reação catalisada por uma (L-leucina-aminotransferase) das três enzimas conhecidas que necessita de cobalamina como grupo prostético (KOHLMEIER, 2003).

A produção endógena de HMB ocorre principalmente no fígado e nos músculos (SABOURIN; BIEBEER, 1982), contudo, outros tecidos, em menor grau, podem também sintetizar o HMB em menor proporção (NISSEN; ABUMRAD, 1997). A síntese pode iniciar no citoplasma e nas mitocôndrias de células musculares, através da transferência do grupamento amino da leucina para o α -cetoglutarato pela enzima transaminase de aminoácido de cadeia ramificada (BCAAT). O produto desta etapa é o α -cetoisocaproato (KIC), que posteriormente sofre descarboxilação oxidativa irreversível pela ação da enzima desidrogenase de α -cetoácido de cadeia ramificada (BCKD). Essa enzima é um grande complexo presente na matriz mitocondrial, consistindo de múltiplas cópias de apenas três distintas subunidades. A subunidade E1 catalisa a reação de descarboxilação usando uma CoA reduzida como co-substrato. A subunidade E2 ancora um resíduo de ácido lipóico, o qual serve como acceptor para o substrato descarboxilado, e posteriormente, o transfere para o acetil-CoA, e reduz a lipoamina a dihidrolipoamina no processo. A subunidade E3 é o componente lipoamina desidrogenase. Ela transfere o hidrogênio da dihidrolipoamina para a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) via flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O complexo enzimático é inativado por fosforilação, mediado pela 3-metil-2-oxobutanoato desidrogenase (lipoamina) quinase, e ativado por desfosforilação pela 3-metil-2-oxobutanoato desidrogenase (lipoamina) fosforilase. Aproximadamente 90% do KIC é descarboxilado a isovaleril-CoA nas mitocôndrias hepáticas. O isovaleril-CoA passa por reações sequenciais na mitocôndria dando origem ao β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), o qual é transformado em acetoacetato e acetil-CoA pela HMG-CoA liase (DRISKELL, 2007).

A principal via de produção de HMB parece ocorrer no citoplasma das células hepáticas (XU, *et al.*, 2000). Os aproximadamente 10% restantes do KIC, que não foram metabolizados pela BCKD, são oxidados a HMB pela enzima KIC dioxigenase

(KICD). Esta via necessita do oxigênio molecular e do ferro e pode ser idêntica a 4-hidroxi-fenilpiruvato dioxigenase, a qual é uma importante enzima do metabolismo do aminoácido tirosina (SABOURIN; BIEBER, 1982).

Como a concentração hepática de KIC é $<5\mu\text{N}$ e a BCKD possui um K_m vinte vezes menor que KICD, acredita-se que a produção de HMB seja regulada principalmente pela contração de KIC e pela atividade das enzimas BCKD e KICD (VAN KIEVERING ; NISSEN, 1992). A atividade da KICD no fígado de humanos é de aproximadamente 0,9mU/g de tecido, o que representa aproximadamente 14,2% da atividade total da NCKD (XU, *et al.*, 2000). Em ratos, este valor está próximo de 1%. Fato este colocado, pelos mesmos autores, é que esta via pode ser importante também para os humanos. Embora não existam dados dos fatores que controlam a atividade da KICD em humanos, sabe-se que a atividade física pode aumentar a atividade desta enzima em ratos, porém o mesmo não ocorre com a ingestão de uma dieta rica em BCAA (XU, *et al.*, 2000)

Outra via que possivelmente pode contribuir para produção de HMB é a via da β -metil-croconil-CoA, um dos produtos intermediários do metabolismo do isovaleril-CoA, a HMG-CoA, pela enzima enol-CoA hidrase. Contudo, esta via parece ser ativa somente em caso de deficiência de biotina (NISSEN; ABUMRAD, 1997). Não existem relatos sobre a produção diária exata de HMB em humanos, mas extrapolando a partir de dados obtidos de suínos, estima-se que um homem de aproximadamente 70 kg produza entre 0,2-0,4g de HMB/dia, dependendo principalmente da sua ingestão de leucina. A concentração plasmática basal de HMB no estado pós-absortivo em humanos está próxima de 1-4 μM (NISSEN; ABUMRAD, 1997), contudo outros autores colocam que este valor poderia ser considerado zero (VUKOVICH, STUBBS, BOHLKEN, 2001).

2.8.4 Doses Utilizadas, Segurança e Efeitos Adversos

O HMB também pode ser chamado de β -hidroxi-isovalerato e, na forma de ácido, é chamado de ácido β -hidroxi- β -metilbutírico ou ácido β -hidroxi-isovalérico. O sal de cálcio do ácido HMB, forma um monohidrato com fórmula química $\text{Ca}(\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (CaHMB monohidrato ou cálcio hidroximetilbutirato), com massa molecular 293, no qual o elemento cálcio, corresponde a 13,7% do peso molecular. Este composto, quando colocado em água, dissolve-se rapidamente formando uma

solução saturada a 27% (p/p) a 20°C (WILEY; DOBBIN, 2004). A adição de HMB a suplementos ou a comercialização do produto se faz, na grande maioria, na forma de CaHMB monohidrato, o qual pode ser encontrado em formulações em pó, cápsulas ou substitutas de refeição. Em sua maioria, os trabalhos envolvendo a suplementação com HMB utilizam doses entre 1-3 g/indivíduo/dia (NISSEN; SHARP, 2003), porém há estudos com doses de 6 g.dia⁻¹ ou ainda, as doses podem ser ministradas de acordo com o peso dos indivíduos. Exemplos de doses encontradas em alguns estudos podem ser 38 mg.kg.⁻¹.dia⁻¹ a 76 mg.kg.⁻¹.dia⁻¹ (VAN KOEVERING; NISSEN, 1992; GALLAGHER, *et al.*, 2000a; PETERSON, *et al.*, 1999). Estes valores correspondem a aproximadamente 3 e 6 g.d⁻¹ para indivíduos com massa corporal próxima de 80 kg. Contudo, foi demonstrado que a utilização de 6 g.d⁻¹ não promoveu resultado significativamente diferente quando comparado ao uso de 3 g.d⁻¹ (GALLAGHER, *et al.*, 2000b).

Nas doses preconizadas na literatura, a suplementação com HMB não trouxe nenhum efeito colateral deletério aparente (PETERSON, *et al.*, 1999). Estudos em modelos animais não demonstraram nenhum efeito tóxico com doses maiores que 100 g.dia⁻¹ (NISSEN; ABUMRAD, 1997). Estudo em ratos, utilizando dietas com até 5% de HMB por 91 dias não provocaram mudança em nenhum dos 18 parâmetros hematológicos nem nos 17 parâmetros bioquímicos analisados. Assim como também não provocou alteração perceptível nos pesos e na aparência dos principais órgãos e algumas glândulas dos indivíduos de ambos os sexos. A suplementação com HMB, em humanos, não causou nenhum efeito colateral após a utilização de doses elevadas por mais de sete semanas (NISSEN; ABUMRAD, 1997). Estudos clínicos por períodos de até 12 semanas não demonstraram nenhum potencial efeito tóxico (NISSEN; ABUMRAD, 1997; NISSEN, *et al.*, 2000). Entre estes estudos foram realizados levantamentos com questionários objetivando a pesquisa de efeitos adversos, porém nada foi encontrado.

2.8.5 Cinética após a Ingestão

Um dos destinos da molécula de HMB após sua síntese ou ingestão é sua excreção na urina (VUKOVICH, STUBBS, BOHLKEN, 2001). Valores obtidos em estudos com suínos e ovinos suplementados, relataram excreção de até um terço do HMB ingerido (NISSEN; ABUMRAD, 1997), enquanto que em humanos

suplementados com HMB, este valor alcançou 50% da dose administrada (GALLAGHER, *et al.*, 2000b). Aparentemente o *turnover* do HMB pode ser considerado rápido. Alguns protocolos, avaliando a meia-vida, foram de aproximadamente 2 horas (NISSEN; ABUMRAD, 1997). Um estudo em particular com humanos investigou a cinética do HMB após ingestão de 1g ou 3g. Os resultados encontrados foram que as concentrações plasmáticas de HMB atingem pico de, aproximadamente, 118 nmol.ml^{-1} após a ingestão de 1g, já a ingestão de 3g, teve um pico de aproximadamente 480 nmol.ml^{-1} em apenas 1 hora. A meia vida plasmática foi de aproximadamente duas horas e meia, enquanto que a excreção na urina foi dependente da dose, 14% para a dose de 1g e 29% para de 3g. Contudo, quando o HMB é ingerido juntamente com glucose, foi demonstrado que esse procedimento é capaz de provocar interferência na cinética do HMB, pois houve um atraso de aproximadamente 1 hora e, diminuição do pico de HMB plasmático. Ao mesmo tempo, houve pequeno aumento da meia-vida plasmática, o que pode estar relacionado a leve diminuição na excreção urinária de HMB. Outra constatação dos autores neste estudo foi a provável ausência de interferência da insulina na cinética do HMB (VUKOVICH, *et al.*, 2001). Indivíduos que apresentaram concentrações basais de HMB plasmático de $2,8\mu\text{M}$ estavam com suas concentrações plasmáticas elevadas até 12h após a última ingestão do suplemento, $10,7\mu\text{M}$ e $20,3\mu\text{M}$ para a ingestão de 1,5 e 3g de CaHMB, respectivamente (NISSEN, *et al.*, 1996). Como o HMB aparentemente não aparece nas fezes, acredita-se que ele seja totalmente absorvido (DRISKELL, 2007).

2.8.6 Efeitos da Suplementação com HMB sobre a Sinalização Intracelular

O cultivo *in vitro* de miotúbulos C2C12 na presença de HMB pode inibir a proteína quinase C- α (PKC α), a qual pode estar relacionada com a diminuição da atividade e a expressão de componentes do sistema ubiquitina proteassoma ATP-dependente (SMITH, WYKE, TISDALE, 2004). Em estudo posterior, os mesmo autores demonstraram haver diminuição da expressão das subunidades alfa e beta da estrutura 20S e da proteína p42 da estrutura 19S do complexo 26S do proteassoma, após a suplementação com HMB (SMITH, WYKE, TISDALE, 2005). Em adição o HMB demonstrou ter a capacidade de bloquear a ativação da PKC

induzida pelo fator indutor de proteólise (PIF), molécula encontrada em concentrações aumentadas em indivíduos com câncer.

A ativação da PKC induz a fosforilação e a ativação do complexo I κ B α , responsável pela fosforilação do I κ B α , levando a ubiquinação e a degradação deste último no complexo proteassoma 26S. Isto permite que o NF- κ B se transloque para o núcleo e altere a expressão gênica (SMITH, WYKE, TISDALE, 2004; SMITH, WYKE, TISDALE, 2005). Este evento está relacionado com o aumento da concentração de proteínas do sistema ubiquitina proteassoma ATP-dependente (TISDALE, 2005). O PIF induz a diminuição do I κ B α citosólico e o aumento da ligação do NF- κ B a região promotora do núcleo relacionada com o aumento da expressão de genes das vias proteolíticas. O HMB na concentração de 50 μ mol.L⁻¹ atenua, efetivamente, a degradação do I κ B α na presença de PIF em miotúbulos de roedores, impedindo o acúmulo de NF- κ B (SMITH, WYKE, TISDALE, 2004). Desta maneira, as vias de expressão de proteína do proteassoma, de inibição de síntese protéica e do reparo celular são atenuadas pela presença do HMB, diminuindo o desequilíbrio no metabolismo protéico muscular (NUNES; FERNANDES, 2008) (figura 8).

meio do aumento da formação do complexo ativo eIF4F ocorre independentemente dos aumentos nas concentrações séricas de insulina (ANTHONY, *et al.*, 2001), apesar das concentrações plasmáticas basais de insulina serem importantes para maximizar os efeitos da leucina da síntese protéica (STIPANUK, 2007), pois esta exerce efeito permissivo para a estimulação da síntese protéica estimulado pela leucina (ANTHONY, *et al.*, 2002).

A suplementação com β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), um metabólito da leucina, diminui significativamente a proteólise induzida pelo exercício mensurada pela concentração de 3-metil-histidina na urina (NISSEN, *et al.*, 1996), além de aumentar a massa magra (VUKOVICH, STUBBS, BOHLKEN, 2001; JÓWKO, *et al.*, 2001). O HMB também tem sido mostrado ser capaz de inibir a degradação protéica e estimular a síntese protéica em ratos em estado de caquexia (SMITH, *et al.*, 2005). O efeito do HMB, sobre a atrofia induzida pelo tumor, é mediado pela inibição do fator indutor de proteólise (PIF) em aumentar a atividade da via da ubiquitina proteassoma, através da sinalização que leva a ativação do NF- κ B (SMITH, *et al.*, 2004), o qual tem sido relatado causar severa degeneração muscular em ratos (CAI, *et al.*, 2004).

Foi também demonstrado que o cultivo de linhagens celulares em atrofia, quando expostas ao HMB, apresentam aumento da fosforilação do mTOR, da proteína ribossomal de 70-kDa S6 (p70^{S6k}), da 4E-BP-1 além de aumentada associação do eIF4E com o eIF4G (ELEY, *et al.*, 2007). Estes efeitos do HMB sobre a atrofia muscular são importantes, já que uns dos efeitos da atrofia muscular induzida pelo desuso é a diminuição da iniciação da tradução (BODINE, *et al.*, 2001). Diante disto, pode-se postular que o uso de HMB atenuaria a proteólise muscular induzida pela imobilização. Até a presente data, não existe estudo publicado na base de dados da pubmed que investigou a combinação da suplementação com HMB na atrofia muscular esquelética induzida pela imobilização em posição de encurtamento do membro posterior em ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES, ENZIMAS E SOLUÇÕES

Todos os componentes dos tampões e os solventes foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústrias Brasileira S/A. Todos os anticorpos policlonais foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology e os anticorpos anti-IgG de coelho e de camundongo conjugados com a enzima Horseradish Peroxidase (HRP) e Substrato Quimiluminescente ULTRA Super Signal foram adquiridos na Pierce. O HMB (em forma de sal de cálcio, pureza 99% avaliada por cromatografia líquida de alta performance) foi doado pela Metabolic Technologies Inc. (Ames, IA, USA).

3.2 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, UFPR – Campus do Centro Politécnico, Curitiba, Paraná, com idade de 70 dias. Os ratos foram mantidos em gaiolas com até três animais, em sala com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, sob ciclo de iluminação claro/escuro invertido de 12/12 horas, com livre acesso à água e ração contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos (Nuvilab CRI, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (nº do processo: 23075.062045/2009-46; anexo). Todos os procedimentos utilizados estão de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em “Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)”.

Este estudo utilizou dois grupos experimentais, cada qual contendo em média 15 animais (salvo, quando descrito um número diferente nas legendas das figuras dos resultados), distribuídos da seguinte maneira: grupo submetido ao procedimento de imobilização da pata posterior esquerda na posição de encurtamento durante sete dias e suplementado com placebo (carbonato de cálcio - CaCO_3) e grupo

submetido ao procedimento de imobilização da pata posterior esquerda na posição de encurtamento por sete dias e suplementado com HMB. Todos os animais de ambos os grupos tiveram a pata posterior contra-lateral, ou seja, a pata posterior direita, como controle intra-grupo.

O músculo sóleo foi escolhido para este estudo porque ele cruza somente a articulação do tornozelo e as secções cruzadas histológicas tomadas do ventre medial contêm todas as fibras musculares (PEVIANI, *et al.*, 2007). Foi escolhido este período de imobilização do membro para estudar os parâmetros relacionados com atrofia no nosso estudo, porque, tem-se demonstrado que este período de tempo num modelo de atrofia por desuso, através da suspensão da cauda para atrofiar os músculos da pata posterior, é o suficiente para aumentar a taxa de perda de proteína do músculo estudado (THOMASON, BIGGS, BOOTH, 1989) (figura 9).

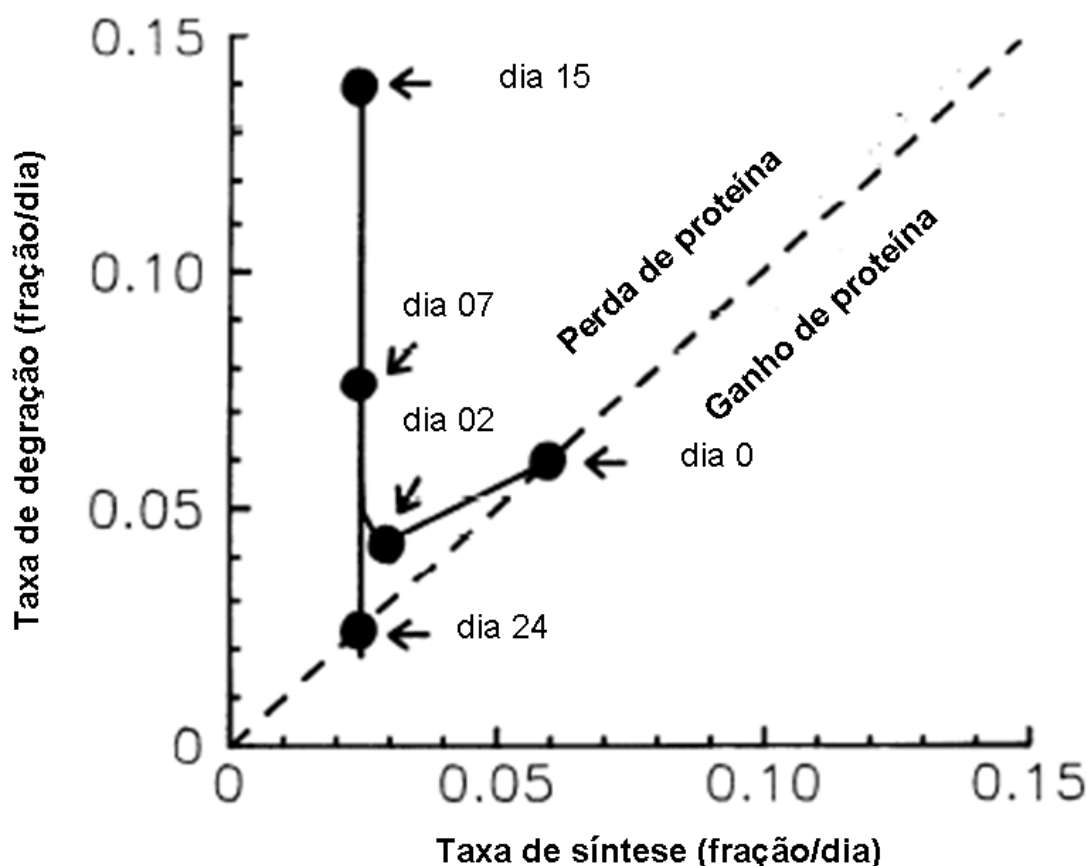


FIGURA 9 – Contribuição relativa da taxa de síntese e de degradação de proteínas miofibrilares de um músculo sóleo de animal submetido a suspensão da cauda. A figura mostra que existe um equilíbrio entre a síntese e degradação protéica ao dia 0, não existindo perda e nem ganho de proteína miofibrilar. Porém ao segundo dia, a

perda de proteína miofibrilar foi decorrente de uma queda na síntese protéica ao invés de um aumento na proteólise. Contudo ao sétimo dia, a queda na síntese protéica e o aumento na proteólise contribuem para o aumento da perda de proteínas miofibrilares (adaptado de THOMASON, BIGGS, BOOTH, 1989).

O período de imobilização dos animais foi de sete dias de duração e todos os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais:

- a) Grupo submetido ao procedimento de imobilização da pata posterior esquerda na posição de encurtamento e suplementado com placebo: os animais tiveram a articulação tíbio-társica esquerda imobilizada em flexão plantar máxima durante um período de sete dias para promover atrofia muscular esquelética num modelo de desuso. Foi utilizado um modelo de imobilização da pata posterior esquerda para atrofiar principalmente o sóleo, figura 10 (COUTINHO, *et al.*, 2002). Os animais foram mantidos em gaiolas contendo até três animais por gaiola. A posição de encurtamento do músculo sóleo foi mantida por uma fita adesiva (WILLIAMS, 1988). Estes animais foram suplementados com CaCO_3 todos os dias durante o período de imobilização no horário entre 09h00min e 10h00min. Os músculos sóleos destes animais foram divididos em dois grupos: músculos sóleo não imobilizados (sóleo direito), o qual nós chamamos de grupo não imobilizado e não suplementado com HMB, ou seja, grupo controle (C); e, sóleo imobilizados, o qual nós chamamos de grupo imobilizado não suplementado com HMB (Imob), ou seja, o sóleo esquerdo.
- b) Grupo submetido ao procedimento de imobilização da pata posterior esquerda na posição de encurtamento e suplementado com HMB: estes animais tiveram articulação tíbio-társica esquerda imobilizada em flexão plantar máxima durante sete dias conforme descrito para o grupo anterior. Estes animais foram suplementados com HMB todos os dias durante o

período de imobilização no horário entre 09h00min e 10h00min. Os músculos sóleos destes animais foram divididos em dois grupos: sóleo não imobilizados (sóleo direito), o qual nós chamamos de grupo não imobilizado suplementado com HMB (HMB); e, sóleo imobilizados, o qual nós chamamos de grupo imobilizado suplementado com HMB (Imob-HMB), ou seja, o sóleo esquerdo.

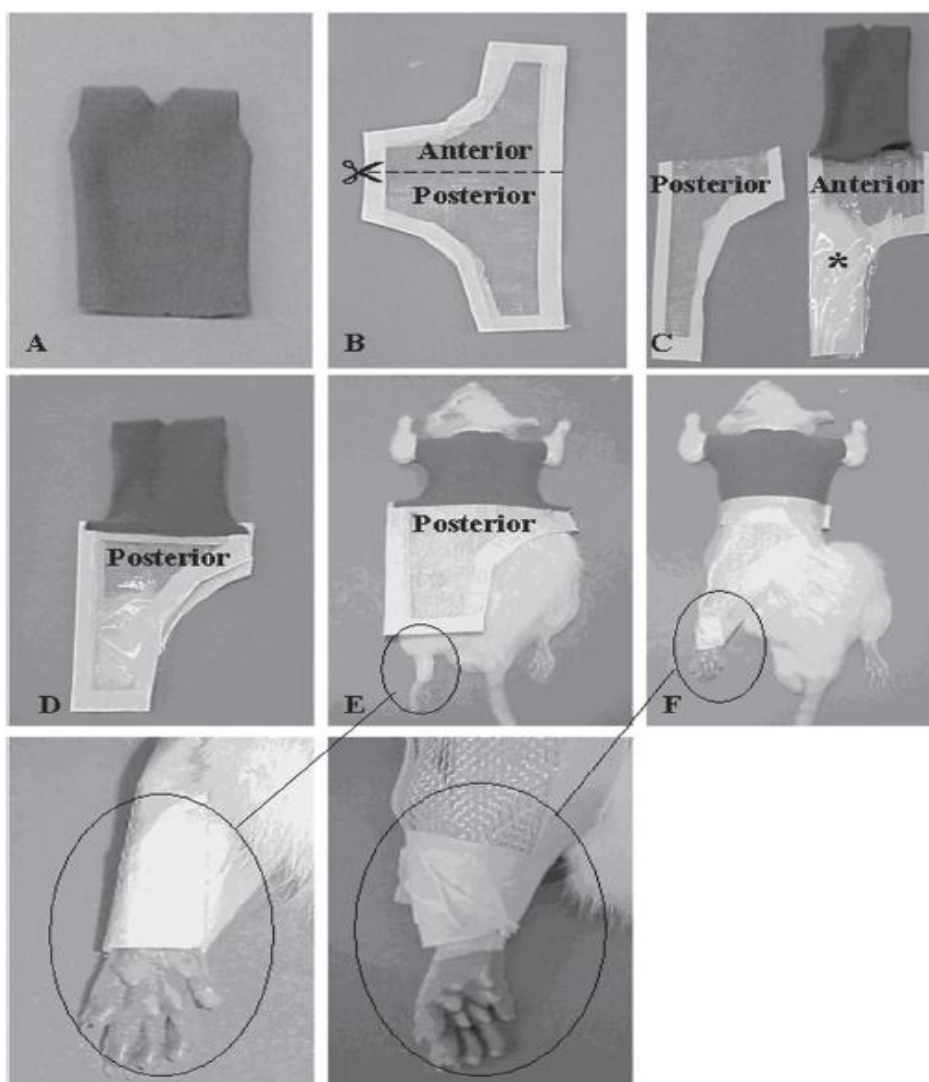


FIGURA 10 – Procedimentos de imobilização da pata posterior esquerda do rato (COUTINHO, *et al.*, 2002).

Um esquema da divisão dos grupos está descrita na figura 11. Nós utilizamos apenas dois grupos de animais (suplementado e não com HMB) como dois grandes grupos, e após esta divisão, nós utilizamos os músculos sóleos direito não imobilizado como controle do esquerdo imobilizado, o que no final totalizava quatro grupos. Nós não utilizamos um terceiro grupo como controle não submetido ao

procedimento de imobilização, porque tem sido demonstrado que o membro não imobilizado parece não sofrer sobrecarga suficiente para induzir hipertrofia muscular esquelética (AOKI, *et al.*, 2004).

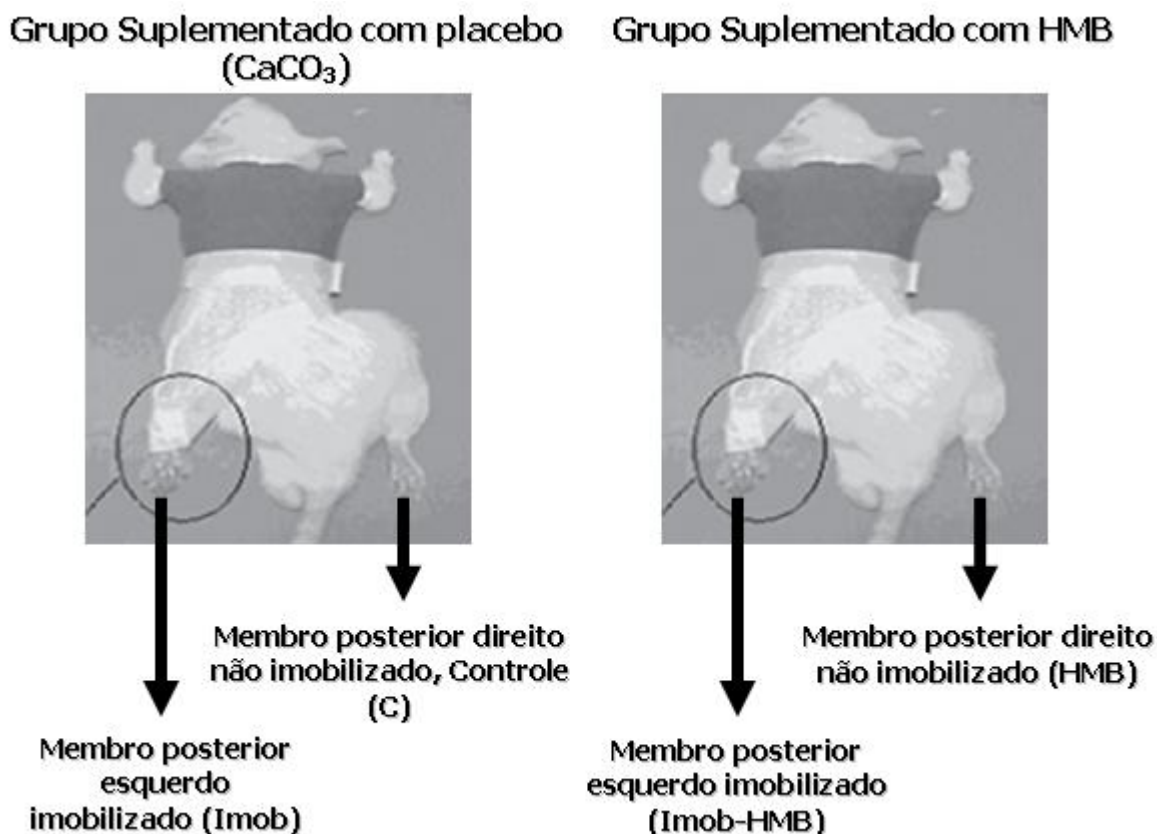


FIGURA 11 – Representação esquemática da distribuição dos grupos.

3.4 PESAGEM DOS ANIMAIS E DO SOLÉO

Durante o de imobilização os animais foram pesados a cada três dias no momento que antecederia a suplementação utilizando-se a balança (Urano). Após a ortotanásia dos animais, o sóleo foi retirado e rapidamente pesado em balança analítica digital (Denver Instrument XL-410).

3.5 SUPLEMENTAÇÃO COM HMB

Os animais foram suplementados com CaCO_3 ou HMB durante sete dias de imobilização por gavagem. A cada semana eram preparadas soluções de estoque de CaCO_3 e sacarose (10%) e de HMB e sacarose (10%), pois, após duas semanas

existe degradação progressiva do HMB em solução (NISSEN et al. 1996). A partir destas soluções de estoque retiravam-se alíquotas diárias para administração por gavagem aos animais.

A dose de HMB correspondeu a $76 \text{ mg de HMB.kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ porquê é uma dose equivalente a dose utilizada em estudos envolvendo a suplementação com HMB em humanos (GALLAGHER, *et al.*, 2000a; GALLAGHER, *et al.*, 2000b), a qual, corresponde a aproximadamente 3 a 6 g.dia^{-1} de HMB para um indivíduo de 80 kg (GALLAGHER, *et al.*, 2000a; GALLAGHER, *et al.*, 2000b; NUNES ; FERNANDES, 2008). A dose utilizada na suplementação com CaCO_3 , teve como objetivo equiparar as concentrações de cálcio presente em ambas as soluções de suplementação, pois, o cálcio pode alterar o metabolismo, fenótipo e a plasticidade da musculatura esquelética (CHIN, 2004), assim como, em concentrações elevadas, induzir a quebra de proteínas (GOLL, *et al.*, 2003).

A sacarose esteve presente nas soluções com o intuito de lentificar o processo de esvaziamento gástrico, o que evita o aumento brusco na concentração plasmática de HMB, e conseqüentemente sua excreção renal (VUKOVICH, STUBBS, BOHLKEN, 2001). Os grupos suplementados com placebo receberam solução de sacarose acrescida de CaCO_3 para equiparar a ingestão de cálcio entre os grupos, visto que o HMB foi administrado na forma de sal de cálcio.

3.6 ORTOTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS MÚSCULOS PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA

Após sete dias de imobilização os animais foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina (95 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg), e quando ficavam totalmente anestesiados, eles eram sacrificados em guilhotina ou por deslocamento cervical e os músculos sóleos de ambas as patas eram rapidamente e cuidadosamente retirados (figura 11). Em seguida o músculo era pesado em balança analítica (Denver Instrument XL-410), congelado em nitrogênio líquido e em seguida a -80°C , para a posterior realização da técnica SDS-PAGE e Western Blotting para análise da expressão protéica.



FIGURA 12 – Processo de isolamento do músculo sóleo.

3.7 METODOLOGIA ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTÉICO

3.7.1 Quantificação protéica para as análises da síntese protéica

Os músculos foram homogeneizados em tampão de lise na proporção 1:7 com o auxílio de um homogeneizador Politron a 25 rpm/min em gelo, centrifugados por 5 minutos a 18.500 x g (centrifugue 5810R) e o sobrenadante foi coletado para a quantificação protéica.

A quantificação protéica foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este método utiliza o corante Coomassie Blue G-250, o qual se liga à proteína, aumentando a sensibilidade do método devido à formação da coloração azul, passível de ser detectada em comprimento de onda de 595 nm (marca).

A concentração da proteína da amostra desconhecida foi calculada com base em uma curva padrão de uma proteína conhecida (Albumina Bovina Sérica, BSA). Assim, o cálculo era realizado a partir da equação da reta ($y=ax+b$), onde o “y” é a absorbância e “x” a concentração de proteína. O valor de “x” encontrado foi multiplicado pela diluição da amostra (10 vezes) para se obter a concentração de proteína da amostra em $\mu\text{g/ml}$. Após a dosagem protéica as amostras foram diluídas em tampão laemmli 5x e submetidas aos ensaios SDS-PAGE e em seguida ao western blotting (LAEMMLI, 1970).

3.7.2 Separação eletroforética das proteínas

O método Dodecil de Sulfato de Sódio – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) surgiu em 1960, descrito Laemmli, desenvolvido para separar as proteínas por meio dos seus respectivos tamanhos. O SDS é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. Como consequência, tem-se a desnaturação, resultando em longas cadeias polipeptídicas e um aumento das cargas negativas nas proteínas, pois várias moléculas de SDS se ligam na proteína para formar o complexo SDS-proteína para deixá-la carregada negativamente. Isto permite que todas as proteínas migrem do pólo negativo do campo elétrico para o pólo positivo do campo elétrico, portanto, este método depende unicamente do peso molecular das proteínas.

Outra vantagem deste método é a utilização do agente redutor β -mercaptoetanol, o qual quebra ligações dissulfeto dos resíduos de cisteínas das cadeias polipeptídicas, permitindo assim, que as subunidades protéicas sejam analisadas.

O gel de empilhamento foi preparado a 4% para que todas as proteínas migrem na mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação, as proteínas começarão a migrar de acordo com seus pesos moleculares. A concentração do gel de separação depende da proteína a ser analisada, contudo, nós utilizamos um gel de 10%. Os géis foram preparados a partir de uma solução de acrilamida:bisacrilamida (30:1); com a adição de persulfato de amônio e do TEMED para acelerar a polimerização dos géis. Neste sentido, o persulfato de amônio gera radicais livres que levam à polimerização, enquanto o TEMED cataliza a formação destes radicais.

3.7.3 Western blotting

Este método surgiu em 1979, descrito por Towbin (TOWBIN, 1979). A idéia geral deste método é a identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono e policlonais, incluindo a detecção, a quantidade relativa e o peso molecular de proteínas em uma mistura complexa.

Após a separação das proteínas em gel de poliacrilamida, elas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Como existem regiões nos quais

as proteínas não se ligaram na membrana, esta membrana foi incubada num tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em tampão TBST) para evitar que os anticorpos se liguem de maneira inespecífica nas regiões livres, ou seja, nas regiões não ligadas pelas proteínas. Depois de bloqueada, incubou-se a membrana em “overnight” em tampão TBST contendo o anticorpo primário para a proteína desejada. Após esta fase, as membranas eram lavadas e incubadas em tampão TBST contendo o anticorpo secundário por duas a três horas. Para visualizar a interação antígeno-anticorpo, utilizou-se o anticorpo secundário contra para o primário, porém, conjugado com uma enzima, a qual permitirá pela adição de um substrato cromogênico ou de quimioluminescente a visualização da proteína.

Para verificar a expressão protéica da subunidade p65 do NF- κ B, utilizou-se um anticorpo primário (1:1000) anti-p65 monoclonal de camundongo (SC-8008, Lot # G3106) e o anti-corpo secundário (1:5000) anti-camundongo (SC-2005). O segundo anticorpo é conjugado com a enzima Horseradish Peroxidase (HRP), a qual permite a visualização da localização da proteína após a adição do substrato quimioluminescente. As imagens foram analisadas por densitometria pelo programa Image J.

3.8 METODOLOGIA PARA AS ANÁLISES HISTOLÓGICAS DOS MÚSCULOS

3.8.1 Microscopia de luz

Um fragmento transversal obtido do ventre de cada músculo sóleo foi seccionado e fixado por imersão em solução ALFAC (álcool 80%:formaldeído 40%:ácido acético glacial na proporção 85:10:5) por 16 horas, a 4°C. Após o processo de fixação, o material foi desidratado pela passagem em bateria de álcool 70%, 80%, 90%, 95% e duas vezes no álcool 100% por 1 hora em cada solução. Com o material completamente desidratado, este permaneceu 1 hora em solução álcool 100%:Xilol (1:1); somente Xilol por 1 hora e novamente Xilol por 30 minutos para a realização da diafanização. A inclusão foi feita com parafina derretida em estufa a 60°C por 2 horas e após, realizada a emblocagem do material com nova parafina.

Com o material emblocado para o preparo e montagem das lâminas permanentes, realizou-se primeiramente a trimagem do material para retirar o

excesso de parafina, e após a microtomia em micrótomo para microscopia de luz em cortes de 5µm de espessura. Assim, os cortes foram colados nas lâminas com albumina diluída em água e glicerol (1:1:1). Com os cortes colados, as lâminas foram preparadas para a coloração.

A coloração se iniciou com a hidratação do material, uma vez que o corante estará em solução aquosa e o material desidratado. Dentro da capela, as lâminas foram passadas na seguinte ordem:

- xilol I por 5 minutos;
- xilol II por 5 minutos;
- álcool 100% I por 5 minutos;
- álcool 100% II por 5 minutos;
- álcool 90% por 5 minutos;
- álcool 80% por 5 minutos;
- álcool 70% por 5 minutos;
- água destilada por 5 minutos.

Após a coloração cada lâmina passou pela desidratação, bateria de soluções descritas acima de forma inversa.

As colorações escolhidas foram Hematoxilina/Eosina com a composição, tempo e ordem de cada solução para coloração no quadro 1.

Solução	Composição	Tempo
<u>Hematoxilina/Eosina</u>		
1- Hematoxilina de Harris	Hematoxilina alcoólica 10% Sulfato de alumínio de potássio a 5% em água destilada Óxido de mercúrio a 2,5%	1 min
2- Eosina Floxina	62mL de eosina 1% 6,25 mL de floxina 1% 487,5mL de álcool 95% 2,5mL de ácido acético glacial	15s

QUADRO 1 - Composição e tempo de coloração de cada solução para microscopia de luz.

Posteriormente a coloração e desidratação as lâminulas foram dispostas sobre as lâminas com uma gota Entellan[®] para fixação. Após o tempo de secagem, estas foram analisadas em microscópio de luz em diferentes aumentos.

As secções coradas com H&E foram utilizadas para as análises da área de secção transversa. De 20 a 40 fibras musculares por campo de no mínimo cinco campos diferentes foram examinados (objetiva de 20x) usando o microscópio de captura de imagem calibrado (Carl Zeiss). Utilizou-se o software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para calcular a área de secção transversa das fibras musculares.

3.8.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Após a fixação em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 a 4°C) (KARNOVSKY, 1965), as peças foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 a 4°C. Em seguida o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 durante 1 hora. A contrastação em blocos foi realizada com acetato de uranila 2% durante 2 horas. O material foi desidratado em série alcoólica crescente por 10 minutos e em seguida colocada em acetona. A impregnação e inclusão ocorreram em resina Epon-812 (LUFT, 1961). Os cortes foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e de diamante. Os cortes ultrafinos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A observação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.9 METODOLOGIAS PARA AS ANÁLISES BIOQUÍMICAS E METABÓLICAS

Após a realização dos ensaios experimentais descritos anteriormente, para verificar se o modelo experimental utilizado com atrofiou a musculatura esquelética

alvo, foram realizados alguns ensaios bioquímicos e metabólicos para encontrar as respostas envolvidas na atrofia.

3.9.1 Avaliação da taxa de proteólise total para os animais submetidos a imobilização de sete dias

A avaliação da taxa de degradação total de proteínas em músculos esqueléticos de ratos foi realizada seguindo os mesmos princípios gerais do modelo experimental do estudo atual, porém, com algumas modificações. Ratos machos e jovens da linhagem Wistar com massa corporal aproximadamente de 120 gramas foram utilizados para realizar este ensaio. Após sete dias de imobilização e suplementação tanto com placebo como com HMB os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente e sacrificados entre 09h00 e 10h00 horas da manhã por deslocamento cervical. Os músculos sóleo foram cuidadosamente dissecados, pesados balança analítica digital (Denver Instrument XL-410), incubados em tampão Krebs-Ringer Bicarbonato (tabela 1) e aerados para quantificação da proteólise.

Para estas avaliações utilizou-se o músculo sóleo íntegro fixado por meio dos seus tendões a suportes plástico num comprimento o mais próximo o possível do repouso. A manutenção dos músculos nestas condições possibilita a difusão de oxigênio e nutrientes, evitando-se a anóxia das fibras musculares centrais. Desta forma, a proteólise muscular é reduzida, há manutenção dos conteúdos de ATP, de fosfocreatina e glicogênio, reproduzindo as características dos músculos em crescimento *in vivo*. Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes e o número total de animais utilizados sendo indicados nas figuras dos resultados.

Assim, a proteólise total foi estimada por meio da liberação de tirosina de proteínas de músculos incubados na presença de cicloheximida, a qual impede a reutilização dos aminoácidos para a síntese de proteínas. A tirosina é um aminoácido normalmente escolhido para a avaliação da proteólise por não ser catabolizado e nem sintetizado "de novo" pelo músculo. Além disso, é facilmente dosado através de um método fluorimétrico simples e de grande sensibilidade (WAALKES; UDENFRIEND, 1957). Essa liberação de tirosina refletiu a taxa de degradação de todas as classes de proteínas celulares.

Sais	Volume	Volume
	150 ml (H ₂ O)	100 (H ₂ O)
NaCl (0,120 M)	1,0521 g	0,701 g
NaHCO ₃ (0,015 M)	0,189 g	0,126 g
KCl (4,828 mM)	0,0539 g	0,035 g
MgSO ₄ (1,2 mM) (anidro)	0,0216 g	0,014 g
KH ₂ PO ₄ (1,212 mM)	0,0247 g	0,016 g
CaCl ₂ (2,4 mM) (anidro)	0,039 g	0,026 g
Glucose (5mM)	0,135 g	0,09
Cicloheximida (0,5 mM)	0,021 g	0,014 g

pH 7,4

TABELA 1 - Composição do Tampão Krebs Ringer Bicarbonato para taxa de proteólise.

Brevemente os músculos eram incubados em meios adequados (tampão Krebs-Ringer Bicarbonato; tabela 1), aerados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e permaneciam por 1 hora em banho sob agitação constante a 37⁰ C, a fim de estabelecer o equilíbrio da velocidade de liberação do aminoácido tirosina para o meio de incubação. Após esse período de pré-incubação, os meios eram renovados e a incubação se processava com o mesmo tipo de meio por mais 2 horas. No final do período de incubação, 500 µl do meio era coletado e adicionado a 200 µl de água milli-q em tubos de ensaios.

Posteriormente adicionou-se 50 µl de TCA (30%) nas amostras, estas foram então incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos, seguida de uma centrifugação a 400g (centrifugue 5810R) por cinco minutos. Ao final da centrifugação, retirava-se uma alíquota de 500 µl do sobrenadante e adicionava-se a 250 µl do reagente 1 mais 250 µl do reagente 2. O reagente: 1 foi composto de 1-nitroso-2-naphthol (0,1%) diluído em álcool etílico (95%); e o reagente 2: composto de ácido nítrico diluído numa proporção de 1:5 (5 ml de ácido nítrico para 20 ml de água milli-q) misturado com 0,5 ml de 2,5% de NaNO₂.

Os tubos de ensaio foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 55°C por 30 minutos. Em seguida esperava-se esfriar e adicionava-se 2,5 ml de

ethylene dichloride. As amostras eram novamente agitadas em vórtex e centrifugadas por 5 minutos a 400g (centrifugue 5810R). Uma alíquota de 200µl do sobrenadante era coletada e colocada nos “Wells” de uma placa preta de fluorescência de 96 “Wells”, e a leitura realizada em um leitor de microplacas (Bio-Rad Microplate Reader – Benchmark) para fluorescência excitando a 460 e medindo a 570 nm.

Para calcular a concentração de tirosina presente nas amostras, realizou-se uma curva padrão, a partir de uma concentração conhecida de tirosina (10^{-3} M; diluída em etanol 10%). Esta curva foi composta de cinco pontos (2×10^{-6} ; 10^{-6} ; 5×10^{-7} ; $2,5 \times 10^{-7}$; $1,25 \times 10^{-7}$). Assim, o cálculo era realizado a partir da equação da reta ($y=ax+b$), onde o “y” é a absorbância e “x” a concentração de proteína. O valor de “x” encontrado foi multiplicado pelo peso do músculo sóleo e por 2, o qual corresponde ao período de incubação das amostras.

3.9.2 Avaliação da taxa de proteólise total para os animais submetidos ao jejum de 48 horas

Para verificar se os possíveis erros metodológicos nos ensaios realizados com o modelo de imobilização, foram realizados ensaios para mensurar a proteólise total de animais submetidos ao jejum de 48 horas. Os modelos de atrofia induzido pelo jejum, é um modelo de atrofia puro, o qual permite comparar se a atrofia induzida pela imobilização utilizado no estudo atual (suplementação aliada a imobilização por sete dias) aumenta a proteólise total.

Brevemente, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos: alimentados (controle); jejum suplementado com placebo e jejum suplementado com HMB. A suplementação seguiu os mesmos procedimentos descritos anteriormente, porém, no preparo da solução de estoque, não era adicionado a sacarose (10%), apenas os sais. Ao final das 48 horas, os animais foram sacrificados conforme descrito anteriormente, e retirou-se o sóleo e o extensor longo dos dedos (EDL) de cada animal, para que o ensaio de proteólise total fosse realizado, de acordo com as descrições anteriores.

3.9.3 Peroxidação lipídica da musculatura esquelética

Estudos iniciais mostraram que a atrofia muscular induzida por imobilização da musculatura esquelética estava associada com a aumentada produção de radicais livres de oxigênio, resultando em lesão oxidativa nas fibras musculares inativas (KONDO, *et al.*, 1992; KONDO, NISHINO, ITOKAWA, 1994). Neste sentido, nós buscamos avaliar quais os efeitos da suplementação com HMB sobre esta condição, pois, se o HMB tiver efeito anti-catabólico, ele também poderia de alguma forma modular a produção de espécies reativas de oxigênio na musculatura esquelética atrofiada.

A peroxidação lipídica foi mensurada pelo método descrito por Nourooz-Zadeh *et al.* (1994). Este método quantifica a formação de hidroperóxidos por miligrama de proteína durante a peroxidação lipídica. Neste sentido, este método baseia-se no princípio de que os hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja.

Brevemente, o sóleo foi extraído e homogeneizado em metanol (1:5, w/v) e centrifugados a 18500g (centrifugue 5810R) por 5 minutos a 4°C. Foi retirado 18µl do sobrenadante homogeneizado e colocado em seis *Wells* de uma placa de 96 *Wells*, e em seguida, adicionado 2µl da solução metanólica de trifetilfosfina (TEP; 10mM) em três dos seis *Wells* para que ocorresse a redução seletiva dos hidroperóxidos (os grupamentos hidroperóxidos especificamente presentes em lipídios são convertidos em grupamentos hidroxila quando na presença de TEP, figura 13). As amostras contidas nos três *Wells* restantes receberam 2µl de metanol. Posteriormente as amostras contidas na placa eram homogeneizadas com leve agitação e incubadas em temperatura ambiente durante 30 minutos.

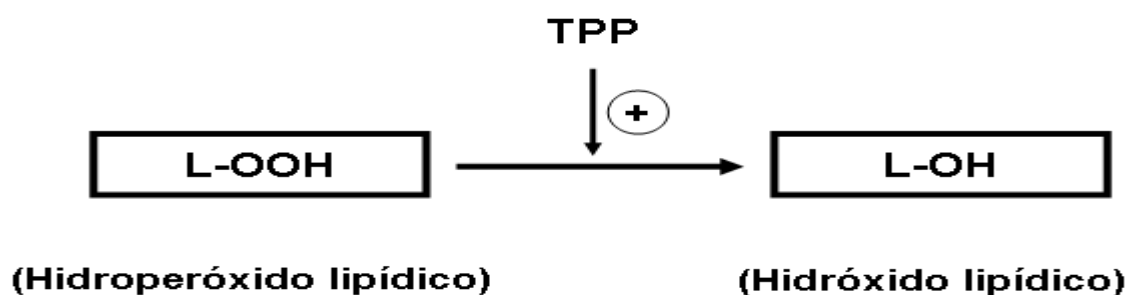


FIGURA 13 – Representação esquemática da redução dos hidroperóxidos lipídicos em hidróxidos lipídicos catalisado pela trifetilfosfina (TEP).

Terminada a incubação, adicionou-se em cada well 180µl do reagente FOX2. Este reagente deve ser preparado somente no momento do uso, e consiste de xilenol laranja 100mM; hidroxitolueno butilado (BHT) 400 mM; ácido sulfúrico 25mM; e, sulfato ferroso de amônio 250 mM em metanol 90% (v:v em água milli-q). Em seguida as amostras são agitadas no vórtex e incubadas novamente por 30 minutos em temperatura ambiente. Nesta etapa, os cátions ferrosos (Fe^{2+}) do reativo FOX2 são oxidados pelos hidroperóxidos presentes na amostra (tanto pelos hidroperóxidos presentes na amostra quanto pelos outros hidroperóxidos presentes na amostra, figura 14). Como os hidroperóxidos lipídicos das amostras tratadas com TPP foram reduzidos, a produção de Fe^{2+} serão menores nas amostras não tratadas com TPP.

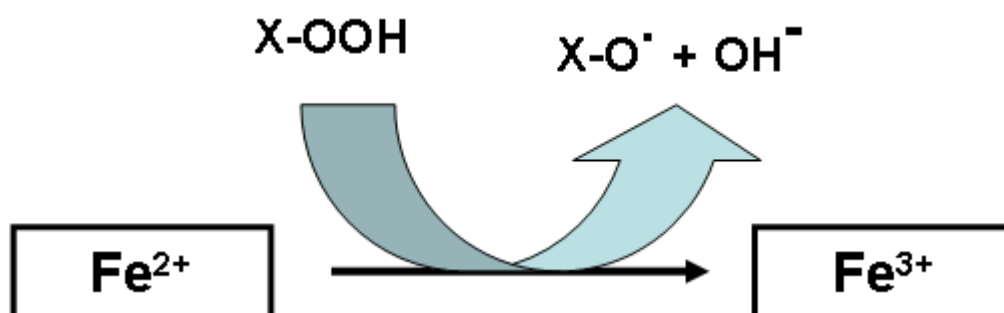


FIGURA 14 – Representação esquemática da oxidação dos Fe^{2+} pelos hidroperóxidos (X-OOH).

Os Fe^{3+} formados nas amostras na presença de xilenol laranja, fazem este indicador passar da cor laranja para a cor azul-púrpura. Passada a incubação, a absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 560 nm. Subtraiu-se o valor da absorbância das amostras tratadas com TPP, ou seja, as amostras sem hidroperóxidos lipídicos, do valor da absorbância das amostras não tratadas com TPP, ou seja, as amostras com hidroperóxidos lipídicos. O valor obtido por essa subtração, referente apenas à quantidade de ferro oxidado por hidroperóxidos lipídicos, foi utilizado na fórmula da curva padrão de peróxido de hidrogênio, obtida com soluções padrão de diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6 µM) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para dosagem de hidroperóxidos (com exceção ao tratamento com TPP). Dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos (nmol/ml) pela concentração de proteínas totais (mg/ml) do extrato metanólico mensuradas pelo método de Bradford, obtendo-se

assim, o valor de hidroperóxidos expressos por nmol de hidroperóxidos/mg de proteínas.

3.9.3.1 Quantificação protéica para a dosagem de lipoperóxidos da musculatura esquelética

Das amostras de tecido muscular homogeneizado em metanol (5:1) e centrifugados a 18000 x g (centrifuge 5810R) por 5 minutos a 4°C e uma alíquota do sobrenadante foi retirado para a quantificação protéica pelo método Bradford (1976). A leitura foi realizada no leitor de microplacas (Bio-Rad Microplate Reader – Benchmark) com absorbância de 595 nm.

3.9.4 Produção de lactato em meio de incubação

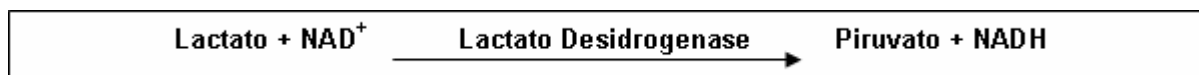
A atrofia muscular induzida pelo desuso é um modelo que altera o fenótipo da musculatura esquelética, e normalmente o fenótipo é estudado por meio de alterações na expressão da cadeia pesada de miosina (MHC) (VERMAELEN, *et al.*, 2007). Contudo, existem estudos analisando o perfil do fenótipo metabólico do músculo atrofiado, por meio da atividade das enzimas lactato desidrogenase e da citrato sintase (VERMAELEN, *et al.*, 2007). Neste sentido, nós fomos verificar quais os efeitos da atrofia muscular induzida pelo desuso sobre a produção de lactato muscular, e verificar se o HMB apresenta alguma propriedade em alterar as possíveis alterações, se ocorrem na produção de lactato.

Para a avaliação da produção de lactato em músculos esqueléticos dos ratos, os músculos sóleo foram cuidadosamente dissecados, pesados balança analítica digital (Denver Instrument XL-410), pré-incubado em erlenmeyers contendo 3ml de tampão Krebs-Ringer (tabela 2), sob agitação constante em atmosfera de O₂/CO₂ (95%/5%) por um período de 30 minutos. Após a pré-incubação, os músculos eram incubados por mais 1 hora em um meio novo.

Ao final da incubação, retirava-se uma alíquota de 20µl do meio de incubação e adicionava 100µl do tampão de lactato (tabela 3) em cada amostra numa placa de 96 “Wells”, sendo que no branco, colocava-se apenas água Milli-Q. Posteriormente as amostras eram incubadas em estufa a 36°C por 45 minutos para agir.

O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDH), ocorrendo consumo de NAD^+ com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra de acordo com a reação 1 (ENGLE; JONES, 1978).

Reação 1 – Reação que permite a mensuração do lactato muscular:



Por fim, as amostras foram lidas no leitor de microplacas (Bio-Rad Microplate Reader – Benchmark) na absorvância de 340 nm, contra referência do branco. A determinação do lactato total produzido foi calculada por meio da equação 1.

Equação 1 – Cálculo da concentração de lactato muscular:

$[\text{Lactato}] \mu\text{M/h/g tecido} = \frac{\text{Densidade óptica} \times 1,2 \times 3 \times 1}{6,22 \times 0,2 \times \text{wwg}}$
--

Onde:

wwg: peso fresco do músculo em gramas.

Solução	Volume
NaCl 0,9 + Hepes 100mM	150 ml
CaCl ₂ 0,11 M	2.25 ml
KH ₂ PO ₄ 2,11%	1.5 ml
MgSO ₄ 3,82%	1,5 ml
KCl 1,15%	6 ml
NaHCO ₃	31,5 ml
Glucose 5,6 mM	0,194 g

pH 7,31

TABELA 2 – Composição do tampão Krebs-Ringer para o ensaio de lactato.

Solução	Quantidade
EDTA	0,28 g
Glicina	2,8 g
Hidrato de hidrazina	1.5 ml
LDH	2,5 µl
NAD ⁺	0,06 g

pH 8,85

TABELA 3 – Composição do tampão de ensaio de lactato para 100 ml de água deionizada (água milli-Q).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Todos os dados revelaram seguir distribuição normal após serem submetidos ao teste de normalidade D'Agostinho Pearson. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) com pós teste de Tukey com significância de $p < 0,05$. A significância de dois grupos diferentes foi determinada pelo teste t de Student. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA).

5 RESULTADOS

5.1 MENSURAÇÃO DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS ENTRE O INÍCIO E O FINAL DO PERÍODO EXPERIMENTAL

Na figura 15 está apresentado a mensuração de massa corporal grupos suplementados ou não com HMB, antes e após 7 dias de suplementação.

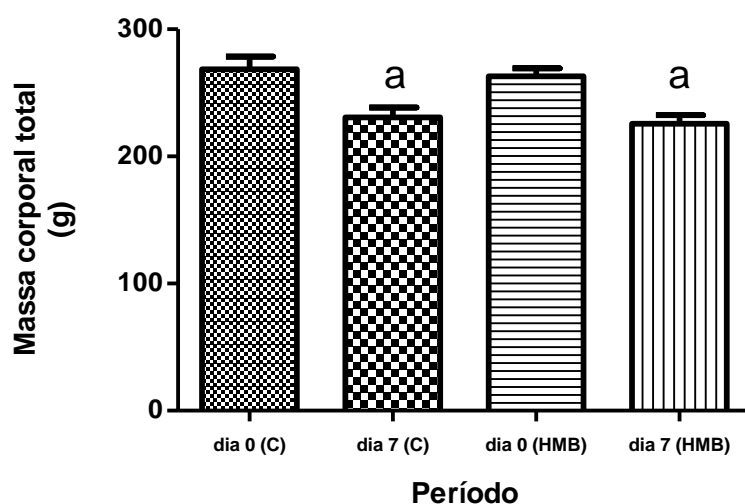


FIGURA 15 – Massa corporal total dos animais submetidos ao procedimento de imobilização da pata posterior esquerda, no início (dia 0) e ao final de 7 dias de suplementação ou não (Controle - C) com HMB. Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 14 a 15 animais por grupo. O mesmo experimento foi repetido três vezes com resultados similares. (^a) $p < 0,05$ quando comparado ao seu período inicial.

Nos animais submetidos à imobilização, sem ou com suplementação com HMB, houve redução da massa corporal ao sétimo de dia de imobilização em comparação aos seus respectivos períodos iniciais. Os animais do grupo controle tinham massa corporal (g) inicial de $268,6 \pm 10,1$ e ao final de 7 dias esta foi de $230,8 \pm 7,7$, a qual corresponde a uma perda de 14,18%. No grupo suplementado com HMB o peso inicial era de $262,9 \pm 6,3$ e foi para $225,7 \pm 6,7$, a qual corresponde a uma perda de 14,12%. Em resumo, a suplementação com HMB não foi capaz de impedir a redução da massa corpórea.

5.2 PESO DO SÓLEO DOS ANIMAIS

Na figura 16 está apresentado os valores obtidos do peso do músculo sóleo dos animais ao final do período experimental.

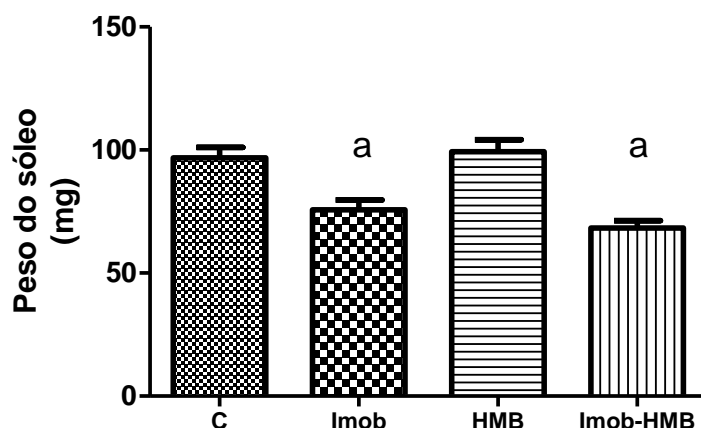


FIGURA 16 – Peso dos músculos sóleo dos animais ao final do período experimental. Músculos das patas posteriores obtidas dos animais do grupo controle (C), pata imobilizada (imob), suplementado com HMB e pata imobilizada e suplementados com HMB (Imob-HMB). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 14 a 15 animais por grupo. O mesmo experimento foi repetido três vezes com resultados similares. (a) $p < 0,05$ quando comparado ao C e HMB.

O modelo de atrofia muscular induzida pelo desuso (Figura 16) utilizado no estudo atual levou a atrofia significativa do músculo sóleo em ambos os grupos. O peso do sóleo dos animais controle (C) foi de 96,8 mg e a imobilização (Imob) provocou redução para 75,7 mg ($p < 0,05$). Isto representou uma perda de 21,8% do peso muscular. O músculo sóleo dos animais suplementados com HMB (HMB) teve seu peso de 99,4 mg e a imobilização no grupo suplementado com HMB (Imob-HMB) levou a um peso de 68,4 mg que significou perda de 31,2%. Novamente, a suplementação com HMB foi incapaz de prevenir ou atenuar a perda de peso do músculo sóleo.

5.3 RELAÇÃO ENTRE O PESO DO SÓLEO PELA MASSA CORPORAL TOTAL DOS ANIMAIS

Algumas vezes podem ocorrer situações onde simplesmente representar os resultados do peso do sóleo sem uma prévia correção pode resultar em valores errôneos. Na figura 17 estão apresentados os resultados obtidos no peso do sóleo após o período experimental corrigido pelo peso corporal dos animais.

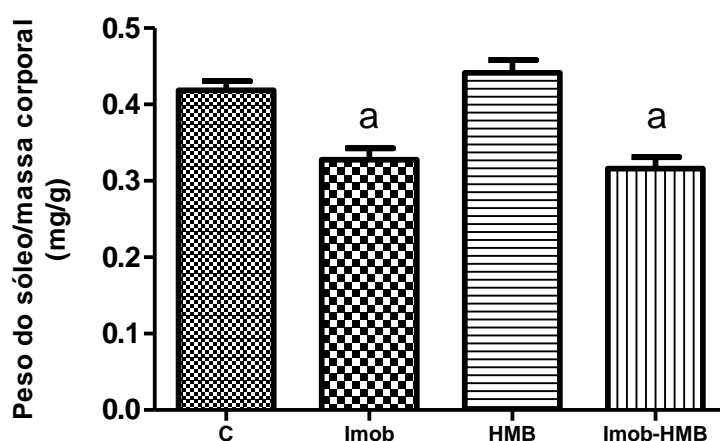


FIGURA 17 – Peso dos músculos sóleo corrigido pela massa corporal dos animais ao final do período experimental. Músculos das patas posteriores obtidas dos animais controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementado HMB e pata imobilizada e suplementados com HMB. Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 14 a 15 músculos por grupo. O mesmo experimento foi repetido três vezes com resultados similares. (^a) $p < 0,05$ quando comparado ao C e HMB.

Os resultados obtidos na figura 17 confirmam que os resultados obtidos na figura 16 são fidedignos, pois a correção pela massa corporal produziu o mesmo achado que o peso muscular isoladamente.

5.4 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Um dos objetivos principais desta abordagem foi verificar se a suplementação com HMB teria efeito sobre a área de secção transversa, pois esta é uma medida

mais sensível de atrofia muscular quando comparada ao peso muscular, pois este pode levar a conclusões errôneas.

O efeito da imobilização sobre a área de secção transversa das fibras musculares dos músculos imobilizados e não imobilizados de ambos os grupos está apresentado na figura 18.

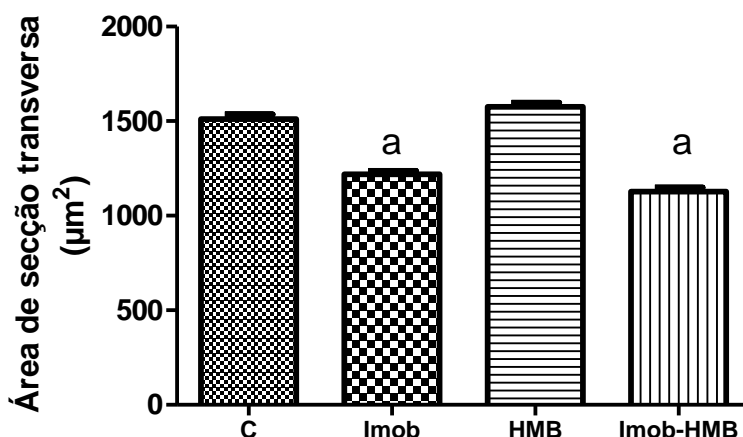


FIGURA 18 – Área de secção transversa das fibras musculares dos músculos sóleo obtidos dos animais controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementado HMB e pata imobilizada e suplementados com HMB. Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 4 músculos de cada membro dos seus respectivos grupos. O mesmo experimento foi repetido duas vezes com resultados similares. (a) $p < 0,05$ quando comparado ao C e HMB.

A imobilização do membro posterior levou a atrofia significativa do músculo sóleo quando comparada aos respectivos músculos controles. No grupo cuja pata não foi imobilizada (C) a área de secção transversa foi de $1511,0 \pm 25,5 \mu\text{m}^2$. A imobilização (Imob) causou redução para $1219,0 \pm 19,0 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$ vs C) equivalente a 19,3%. No grupo não imobilizado e suplementado com HMB (HMB) a área de secção transversa do músculo foi de $1577,0 \pm 21,7 \mu\text{m}^2$, e a suplementação nos animais cuja pata foi imobilizada (Imob-HMB) a área de secção transversal foi de $1127,0 \pm 21,7 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$ vs HMB), que significou redução de 28,5%. Novamente, a suplementação com HMB aos animais com patas imobilizadas não impediu a redução da área de secção transversa.

5.5 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Na figura 19 está apresentado uma micrografia eletrônica de transmissão, representativa, da secção longitudinal do músculo sóleo obtidos dos animais controle (C), pata imobilizada (Imob) e, pata imobilizada e suplementados com HMB (Imob-HMB).

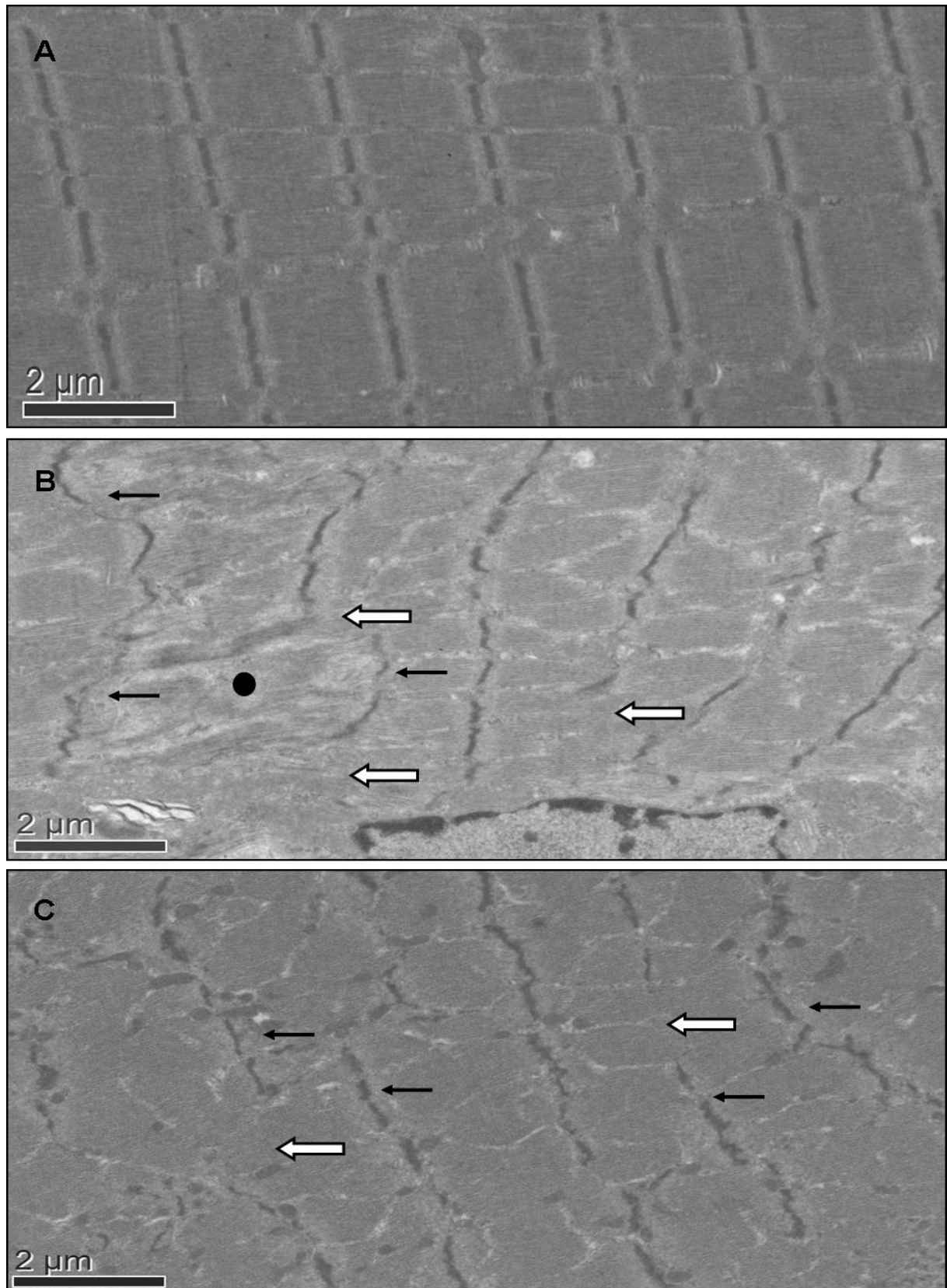


FIGURA 19 – Micrografia eletrônica de transmissão, da secção longitudinal miofibrilar do músculo sóleo obtido dos animais: (a) não imobilizados (Controle - C); (b) grupo cuja pata foi imobilizada (Imob); e (c) grupo cuja pata foi imobilizada e os

animais suplementados com HMB (Imob-HMB). Discos Z estão completamente desalinhados e desestruturados (setas finas); discos Z estão ausentes (setas largas); lesões ou desorganização dos miofilamentos contráteis (circulo fechado).

Uma importante característica de um músculo atrofiado é a desorganização dos sarcômeros e dos filamentos contráteis. A organização ultra-estrutural das fibras musculares obtidas dos grupos experimentais está apresentada na Figura 19 (a, b, c). Na Figura 19a, os sarcômeros e as miofibrilas estão totalmente organizados e, os discos Z, acompanham esta organização, totalmente íntegros e alinhados. Na figura 19b, que é do animal cuja pata foi imobilizada, é visível a desorganização estrutural das miofibrilas e dos seus respectivos sarcômeros, os discos Z estão completamente desalinhados e desestruturados (setas finas), e em algumas situações os discos Z estão ausentes (setas largas), e também é perceptível lesões ou desorganização dos miofilamentos contráteis (circulo fechado). Assim, pode-se afirmar, pela análise ultra-estrutural que a imobilização causou lesões nos sarcômeros das fibras musculares do músculo sóleo. No músculo sóleo obtido de animais cuja pata foi imobilizada e foram previamente suplementados com HMB (Figura 19c), também é nítido a desorganização estrutural das miofibrilas e dos seus respectivos sarcômeros, discos Z completamente desestruturados e com perda de alinhamento (setas finas), e em algumas situações os discos Z estão ausentes (setas largas), lesões ou desorganização dos miofilamentos contráteis. A análise ultra-estrutural nos permite inferir que a suplementação com a HMB não foi capaz de prevenir ou atenuar o dano muscular.

Na figura 20 está apresentado uma micrografia eletrônica de transmissão, representativa, da secção transversal do músculo sóleo obtidos dos animais cuja pata não foi imobilizada, mas receberam HMB (HMB) e animais com pata imobilizada e suplementados com HMB (Imob-HMB).

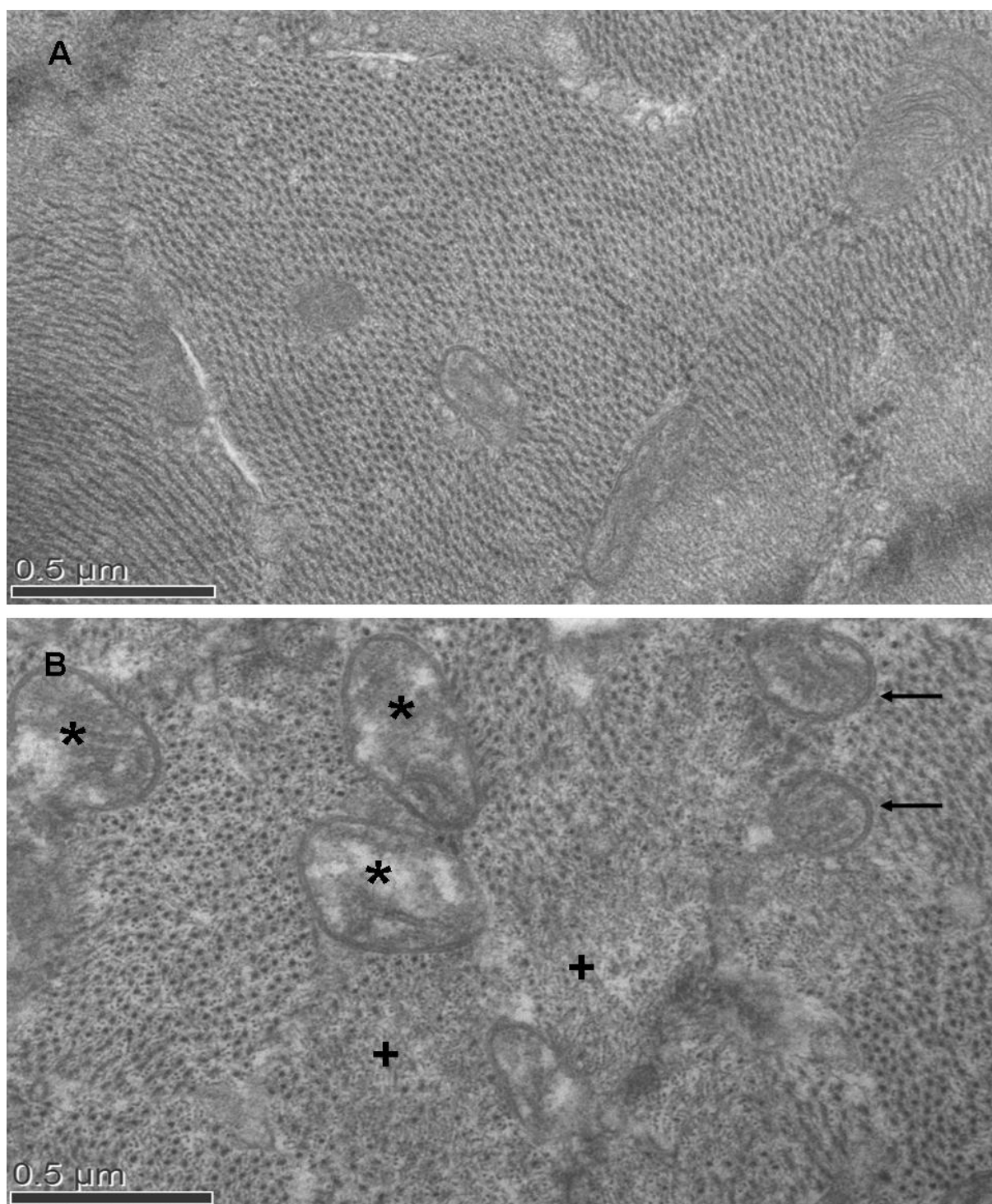


FIGURA 20 – Micrografia eletrônica de transmissão da secção transversal do músculo sóleo obtido dos animais: (a) pata não imobilizada e suplementados com HMB (HMB); e, (b) grupo cuja pata foi imobilizada e os animais suplementados com HMB (Imob-HMB). Lesões miofibrilares (sinal de positivo), mitocôndrias degeneradas (asteriscos) e também algumas normais (setas finas).

No músculo sóleo obtido dos animais cujas patas não foram imobilizadas, mas receberam suplementação com HMB, este metabólito do aminoácido leucina não provocou alteração na organização estrutural e não se observa alteração na disposição das proteínas contráteis nas miofibrilas (Figura 20a). Por outro lado, a imobilização da pata fez com que o músculo sóleo apresentasse desorganização estrutural e desorganização das proteínas contráteis nas miofibrilas (Figura 20b), conforme pode-se observar pelas suas disposições mais distantes uma das outras, lesões miofibrilares (sinal de positivo), mitocôndrias degeneradas (asteriscos) e também algumas normais (setas finas).

5.6 PROTEÓLISE TOTAL DOS MÚSCULOS IMOBILIZADOS

Na figura 21 estão apresentados os resultados sobre de proteólise total nos músculos sóleo, ao final de 120 minutos de incubação.

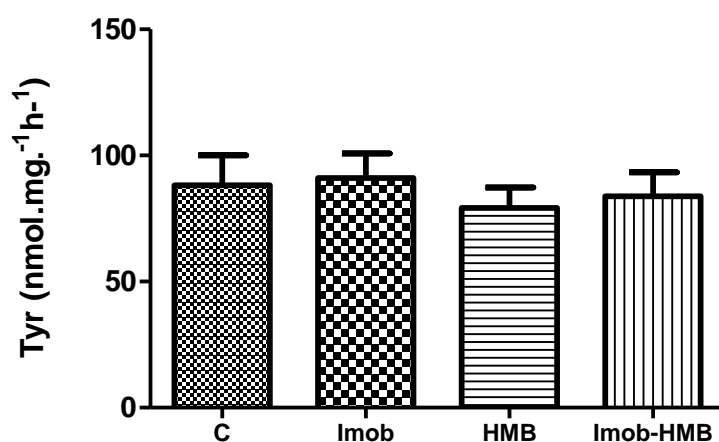


FIGURA 21 – Determinação da proteólise muscular, ao final de 120 minutos de incubação, mensurada pela liberação de tirosina dos músculos sóleos obtidos dos animais dos grupos controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementados com HMB (HMB) e, pata imobilizada e suplementados com HMB (Imob-HMB). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 a 14 músculos por grupo. O mesmo experimento foi repetido três vezes com resultados similares.

A proteólise nos músculos dos animais do grupo controle (C) foi de $88,1 \pm 11,9$ nmol.mg.⁻¹.h.⁻¹ e no grupo cuja pata foi imobilizada (Imob) foi de $91,0 \pm 9,8$ nmol.mg.⁻¹.h.⁻¹

¹. No grupo suplementado com HMB (HMB) a proteólise foi de $79,2 \pm 8,1 \text{ nmol.mg.}^{-1}\text{h}^{-1}$ e nos animais com imobilização da pata e suplementados com HMB (Imob-HMB) a proteólise foi de $83,8 \pm 9,4 \text{ nmol.mg.}^{-1}\text{h}^{-1}$. O procedimento de imobilização atrofiou a musculatura esquelética alvo conforme demonstrado pela área de secção transversa do músculo sóleo (Figura 18), mas por este achado nos não podemos afirmar que isto foi decorrente de um aumento na proteólise, uma vez que não encontramos diferença significativa entre imobilizados ou não e suplementados ou não.

5.7 PROTEÓLISE TOTAL DOS MÚSCULOS DOS ANIMAIS EM JEJUM

Nas figuras 22 e 23 estão apresentados os resultados sobre a proteólise total dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) respectivamente, dos animais submetidos a um jejum de dois dias suplementados ou não com HMB.

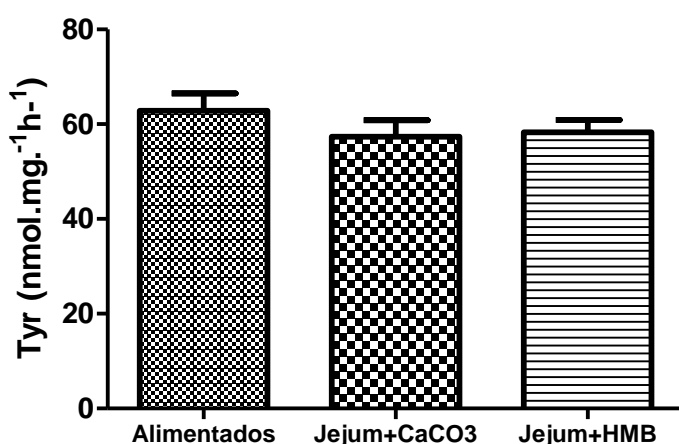


FIGURA 22 – Determinação proteólise total, pela liberação de tirosina, pelos músculos sóleos, obtidos dos animais alimentados, submetidos a um jejum de dois dias suplementados com HMB (Jejum+HMB) ou o veículo (Jejum+CaCO₃). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 8 a 9 músculos por grupo. O mesmo experimento foi repetido duas vezes com resultados similares.

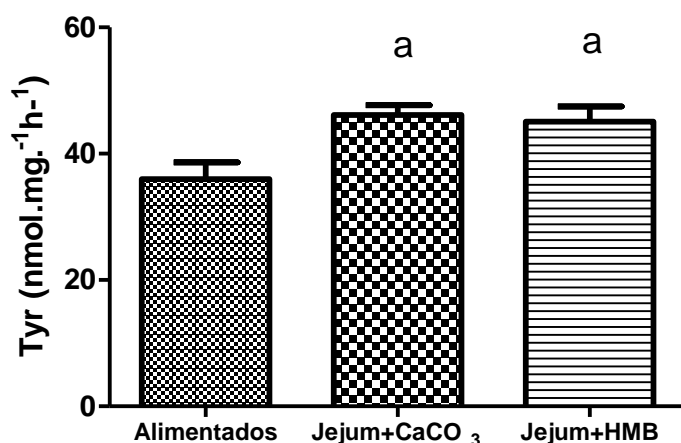


FIGURA 23 – Determinação proteólise total, pela liberação de tirosina, pelos músculos EDL, obtidos dos animais alimentados, submetidos a um jejum de dois dias suplementados com HMB (Jejum+HMB) ou o veículo (Jejum+CaCO₃). Os dados estão apresentados como média ± EPM de 8 a 9 músculos por grupo. O mesmo experimento foi repetido duas vezes com resultados similares. (^a) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo alimentado.

A proteólise total (nmol.mg.⁻¹.h⁻¹) mensurada pela liberação de tirosina, nos músculos dos animais do grupo alimentado, jejum+CaCO₃, e jejum+HMB. No músculo sóleo (Figura 22) não foi observado diferença na proteólise entre os grupos investigados ($p > 0,05$). Por outro lado, no EDL (Figura 23), no grupo alimentado a taxa de proteólise foi de $36,0 \pm 2,6$ nmol.mg.⁻¹.h⁻¹. A indução de 48 horas de jejum elevou a proteólise em $45,1 \pm 2,4$ nmol.mg.⁻¹.h⁻¹, que representou um aumento de 25,3% no grupo suplementado com HMB (Jejum+HMB). No controle jejuado (Jejum+CaCO₃) a proteólise foi de $46,1 \pm 1,6$ nmol.mg.⁻¹.h⁻¹, que significou elevação em 28,0% no, a qual não foi diferente do suplementado com HMB ($p > 0,05$).

5.8 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA

A produção de lipoperóxido, pela musculatura esquelética obtida dos animais cujas patas foram imobilizadas ou não e, suplementados ou não, está apresentada na figura 24.

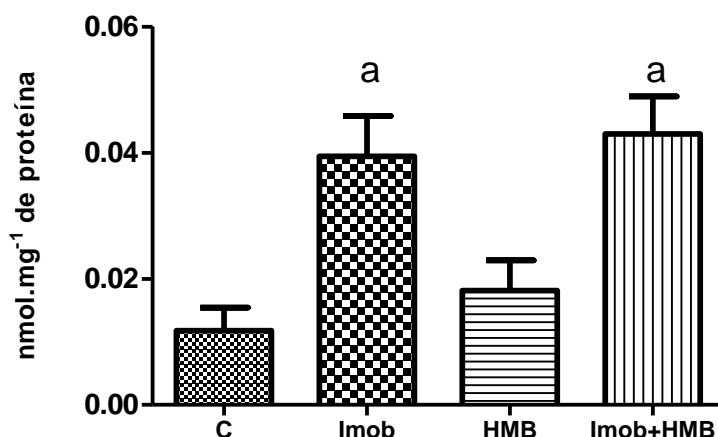


FIGURA 24 – Peroxidação lipídica nos músculos sóleos obtidos dos animais controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementado com HMB e, pata imobilizada suplementados com HMB (Imob-HMB). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 7 a 9 músculos por grupo. O mesmo experimento foi repetido duas vezes com resultados similares. (^a) $p < 0,05$ quando comparado ao C e HMB.

A peroxidação lipídica (nmol.mg⁻¹ de proteína) no grupo controle foi de $0,012 \pm 0,004$. A imobilização induziu a uma elevação da peroxidação lipídica de $0,039 \pm 0,006$, a qual foi de aproximadamente 3,2 vezes maior que a do C ($P < 0,001$). O grupo cuja pata não foi imobilizada, mas recebeu suplementação com HMB (HMB) teve a peroxidação similar à do C ($P > 0,05$) sendo de $0,018 \pm 0,005$. Já no grupo imobilizado e suplementado com HMB (Imob+HMB) a peroxidação foi de $0,043 \pm 0,006$, a qual foi similar à do grupo imobilizado mas não suplementado ($P > 0,05$), contudo foi de aproximadamente 2,4 vezes maior que à do grupo HMB ($P < 0,001$).

5.9 EXPRESSÃO PROTÉICA DA SUBUNIDADE p65 DO NF-kB

Na figura 25 está apresentada uma banda, ilustrativa, da expressão protéica da subunidade p65 do NF-kB e os resultados gerais obtidos deste fator de transcrição em forma de gráfico de colunas.

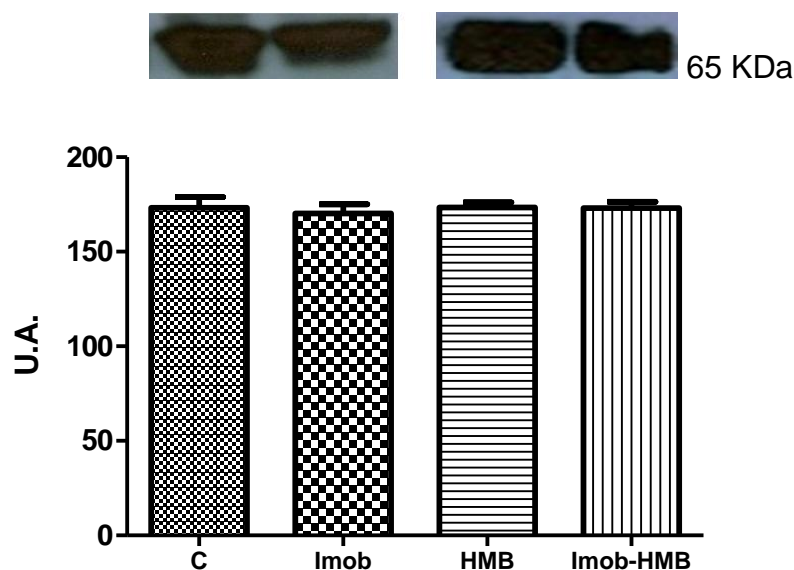


FIGURA 25 – Expressão protéica da subunidade p65 do NF-kB em unidades arbitrárias (U.A.), nos músculos sóleos obtidos dos animais controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementado com HMB e, pata imobilizada suplementados com HMB (Imob-HMB). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 09 a 11 músculos por grupo. O mesmo experimento foi repetido três vezes com resultados similares.

A expressão protéica do NF-kB (U.A.) foi de $173,3 \pm 5,6$ e $170,2 \pm 4,9$ para os músculos obtidos dos animais controle (C) e com patas imobilizadas (imob), respectivamente. Os animais do grupo suplementado com HMB (HMB) apresentaram o mesmo perfil de valores de expressão protéica, ou seja, $173,3 \pm 2,7$ e $173,1 \pm 3,4$ para o grupo com pata não imobilizada e, imobilizado e suplementado com HMB (Imob+HMB), respectivamente. Assim, os valores obtidos referentes a expressão protéica do NF-kB não diferiram significativamente em nenhum dos grupos e também em nenhum dos controles internos dos respectivos grupos. ($p > 0,05$)

5.10 PRODUÇÃO DE LACTATO DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA EM MEIO DE INCUBAÇÃO

A produção de lactato em meio de incubação, pela musculatura esquelética dos animais submetidos à suplementação com placebo e HMB, está apresentada na figura 26.

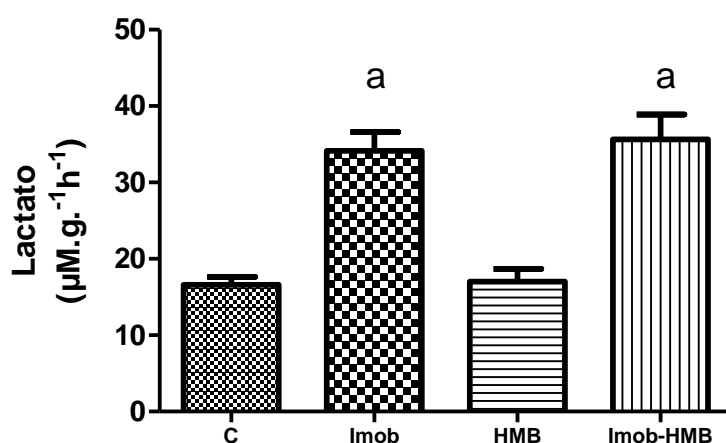


FIGURA 26 – Produção de lactato pelo músculo sóleo incubado obtido dos animais dos grupos controle (C), pata imobilizada (Imob), suplementado com HMB e, pata imobilizada suplementados com HMB. Os dados estão apresentados como média ± EPM de 13 a 15 músculos por grupo. O mesmo experimento foi repetido três vezes com resultados similares. (a) $p < 0,05$ quando comparado ao C e HMB.

A produção de lactato ($\mu\text{mol.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ de tecido) pela musculatura esquelética (Figura 26) no grupo controle (C) foi de $16,6 \pm 1,0$. Após sete dias de imobilização, a atrofia muscular elevou significativamente a produção de lactato para $34,1 \pm 2,5$ a qual foi aproximadamente 2 vezes maior que à do C ($P < 0,001$). A produção de lactato pelo grupo cuja pata não foi imobilizada, mas foi suplementado com HMB (HMB) foi de $17,0 \pm 1,7$, a qual não foi diferente do grupo controle ($P > 0,05$). No grupo com pata imobilizado e suplementado com HMB (Imob-HMB) a produção de lactato foi de $35,6 \pm 3,5$, significativamente maior que à do grupo HMB ($P < 0,001$). A suplementação com HMB não atenuou a produção de lactato dos músculos atrofiados a qual foi similar à do grupo controle ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A musculatura esquelética é um tecido que contribui com aproximadamente 40% da massa corporal total, responsável por funções básicas como locomoção, controle do metabolismo, respiração, etc. A musculatura esquelética apresenta elevada plasticidade, com a capacidade de alterar o seu tamanho e a sua composição de fibras em respostas as mudanças das sobrecargas mecânicas impostas sobre ela (FLÜCK; HOOPELER, 2003) (figura 28).

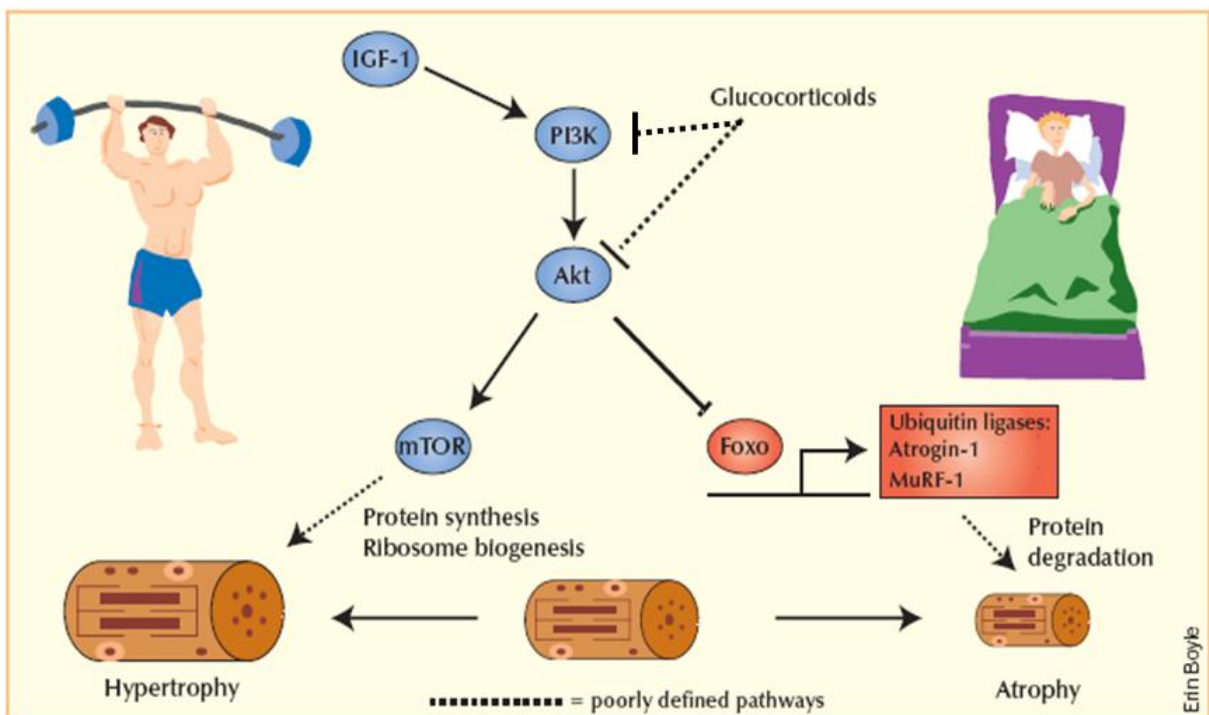


FIGURA 27 – Vias que controlam simultaneamente a hipertrofia e a atrofia muscular esquelética (adaptado de HOFFMAN; NADER, 2004; HU, *et al.*; 2009).

O treinamento resistido e o suporte nutricional estimulam a hipertrofia muscular, a qual é caracterizada pelo aumento no tamanho, conteúdo protéico e força muscular (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; KANDARIAN; JACKMAN, 2006). Inversamente, a inatividade prolongada da musculatura esquelética, que ocorre em situações como repouso total (*bed rest*), imobilização do membro, microgravidade e as lesões da medula espinhal, resulta em perda de massa muscular, comumente

conhecida como atrofia muscular (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; KANDARIAN; JACKMAN, 2006). A atrofia da musculatura esquelética é também uma complicação devastadora de muitas doenças como o câncer, AIDS, sepse, diabetes, doença obstrutiva pulmonar crônica (DPOC), insuficiência cardíaca, terapia com elevada doses de glicocorticóides, lesões por queimaduras e fibrose cística (TISDALE, 2009; VENTADOUR; ATTAIX, 2006). Portanto, pode-se inferir que a atrofia muscular pode surgir de situações que resultem em diminuição da síntese protéica, aumento da taxa de proteólise ou de ambas (VENTADOUR; ATTAIX, 2006). Diante disto, utilizar meios que possam intervir com os efeitos devastadores da atrofia muscular é extremamente importante, pois isto teria impacto direto sobre a capacidade da musculatura esquelética em realizar suas funções básicas.

A suplementação com o HMB foi relatada ser capaz de diminuir, significativamente, a proteólise induzida pelo exercício, mensurada pela concentração de 3-metil-histidina na urina (NISSEN, *et al.*, 1996), além de aumentar a massa magra (VUKOVICH, STUBBS, BOHLKEN, 2001; JOWKO, *et al.*, 2001). A suplementação com HMB, também foi mostrado ser hábil em inibir a degradação protéica e estimular a síntese protéica, em ratos em estado de caquexia (SMITH, *et al.*, 2005). O efeito do HMB sobre a atrofia muscular induzida pelo tumor é mediado pela inibição da secreção do fator indutor de proteólise (PIF), produzido pelo tumor. Este fator foi demonstrado ser capaz de aumentar a atividade da via da ubiquitina proteassoma, através da sinalização que leva a ativação do NF-kB (SMITH, *et al.*, 2004). Este por sua vez causa severa degradação muscular, em ratos (CAI, *et al.*, 2004).

No presente estudo em que ambos os grupos que tiveram suas patas imobilizadas, submetidos à suplementação ou não com HMB, apresentaram diminuição significativa da massa corporal ao sétimo dia de imobilização quando comparado ao primeiro dia. Este nosso achado corrobora o de outros que também demonstraram que a atrofia pela imobilização do membro posterior resulta em perda da massa corporal (ANSVED, 1995; HARJOLA, *et al.*, 2000), e foi sugerido que estes resultados parecem estar relacionados a menor ingestão de alimentos devido à limitação de movimento e ao estresse provocado pela imobilização (ANSVED, 1995). Estudo prévio demonstrou que a suplementação com HMB durante um período de oito semanas, foi capaz de aumentar a massa corporal de ratos da linhagem Wistar (NUNES, *et al.*, 2008). Nosso dado difere do de Nunes *et al.*, talvez porque fizemos

suplementação apenas por uma semana, utilizando a mesma dosagem. Isso demonstra que o fator tempo desempenha papel fundamental no estabelecimento de ganho de massa corporal. Isto também poderia explicar o porque da falta de efeito observado nos animais imobilizados quando submetidos a suplementação com HMB. A suplementação com HMB durante um período de nove dias em camundongos portadores do tumor MAC16 promoveu atenuação na perda de massa corporal induzida pela presença do tumor, contudo, apesar do tempo próximo ao do presente estudo, estes efeitos somente aconteceram em doses de 125 a 250 mg.kg.⁻¹d⁻¹ (SMITH, WYKE, TISDALE, 2005), ou seja, aproximadamente de duas a quatro vezes maior que a dose por nós investigada. Foi escolhida esta dose, porque esta é uma dose fisiológica, talvez em situação patológica haja necessidade de incremento de dosagem para observação de efeito benéfico quanto a ganho de massa corporal, preferencialmente a massa magra. Esta nossa hipótese pode ser suportada pelos estudos que utilizaram doses de 50 mg.kg.⁻¹d⁻¹ (SMITH, WYKE, TISDALE, 2005), o qual é uma dose menor, mas próxima a que usamos no presente estudo, onde os autores relataram que essa dose não foi capaz de atenuar a perda de massa corporal. A suplementação com 3 g.d⁻¹ de HMB durante nove semanas foi ineficaz em alterar a composição corporal (percentual de gordura e massa magra) em particular a massa corporal total em humanos, quando realizada em conjunto com o treinamento resistido (THOMSON, WATSON, ROWLANDS, 2009). Ao reunir todos estes estudos, percebe-se que os resultados ainda não são claros e, que doses fisiológicas de suplementação com HMB parecem ser ineficazes sobre a massa corporal, principalmente, quando o animal é submetido a condições estressantes, como a imobilização da pata ou câncer.

Uma forma eficiente para avaliar se o modelo de indução de atrofia está realmente atrofiando a musculatura alvo, é mensurar alterações no peso muscular (SMITH, WYKE, TISDALE, 2005; GOLDSPINK, 1977; COUTINHO, *et al.*, 2002; GOMES, *et al.*, 2004; CARON, *et al.*, 2009). No presente estudo, encontramos diminuição da massa dos músculos submetidos ao procedimento de imobilização nos animais de ambos os grupos (suplementados ou não), demonstrando que a imobilização foi capaz de atrofiar a musculatura alvo. Estes dados estão em consonância com os de outros estudos, nos quais verificaram que a imobilização resultou em menor massa muscular quando comparada à massa muscular do membro não imobilizado (GOLDSPINK, 1977; COUTINHO, *et al.*, 2002; GOMES, *et*

al., 2004; HARJOLA, JÄNKÄLÄ, HÄRKÖNEN, 2000). Além do mais, encontramos que a suplementação com HMB não foi capaz de atenuar a perda de massa muscular do sóleo da pata imobilizada quando comparada à do sóleo da pata imobilizada do grupo não suplementado. Em outro estudo, foi verificado que a suplementação com HMB foi capaz de aumentar o peso do sóleo de camundongos portadores do tumor MAC16, após oito dias de inoculação do tumor (SMITH, WYKE, TISDALE, 2005). Contudo, a concentração de HMB utilizada no estudo foi de $250 \text{ mg.kg}^{-1}\text{d}^{-1}$ (SMITH, WYKE, TISDALE, 2005), diferente da concentração utilizada no presente estudo ($76 \text{ mg.kg}^{-1}\text{d}^{-1}$), ou seja, uma dose de aproximadamente quatro vezes maior, do que a considerada fisiológica. Novamente, a dose de HMB utilizada no nosso estudo foi de 76 mg de $\text{HMB.kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$, porquê é a dose equivalente a utilizada em estudos envolvendo a suplementação com HMB em humanos (GALLAGHER, *et al.*, 2000a), o qual, corresponde a aproximadamente $3\text{-}6 \text{ g.dia}^{-1}$ de HMB para um indivíduo de 80 kg (GALLAGHER *et al.*, 2000a; NUNES ; FERNANDES, 2008).

Outro parâmetro utilizado para verificar, quantitativamente, a atrofia muscular é por meio da análise da área de secção transversa das fibras musculares (COUTINHO, *et al.*, 2002; GOMES, *et al.*, 2004; CARON, *et al.*, 2009). Tem sido proposto que o efeito anabólico da suplementação com HMB está na sua capacidade de atenuar o aumento da taxa de proteólise (NISSEN, *et al.*, 1996; NISSEN; ARUMBAD, 1997), efeito muito comum que ocorre em situações que resultem em atrofia muscular induzida pela imobilização ou repouso no leito (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; KANDARIAN; JACKMAN, 2006).

O presente estudo demonstrou, por meio da análise da área de secção transversa das fibras musculares, que a imobilização atrofiou significativamente as fibras musculares dos músculos imobilizados quando comparados aos músculos controle da pata contra-lateral de ambos os grupos. Estes resultados estão de acordo com os resultados relatados por outros estudos (COUTINHO, *et al.*, 2002; GOMES, *et al.*, 2004; CARON, *et al.*, 2009). Porém, a suplementação com HMB não foi capaz de atenuar a diminuição da área de secção transversa das fibras musculares do sóleo imobilizado, quando comparada à do sóleo imobilizado do grupo não suplementado (placebo). Talvez a explicação para tal achado resida na equação tempo x dose.

Em outro estudo publicado recentemente foi demonstrado que a atrofia muscular induzida pelo desuso, causa lesões ultra-estruturais nos sarcômeros (SALAZAR, MICHELE, BROOKS, 2010), resultados estes que corroboram os resultados obtidos aqui. Contudo, até o presente momento, nenhum estudo procurou analisar quais os efeitos da suplementação com HMB, em nível ultra-estrutural sobre o sarcômero de músculo atrofiado. Os resultados obtidos aqui, na dose e modelos utilizados, não dão suporte para a hipótese proposta sobre a suplementação com HMB, ou seja, efeito anabólico, anti-proteolítico, protetor contra lesões musculares (NISSEN, *et al.*, 1996; NISSEN; ARUMBAD, 1997; WILSON, WILSON, MANNINEN, 2008).

Um dos principais achados sobre o papel do HMB é a demonstração de seu efeito inibidor da proteólise (NISSEN, *et al.*, 1996; NISSEN; ARUMBAD, 1997). Outra característica da atrofia muscular, além de diminuída área de secção transversa, perda de peso muscular e aumentada lesão estrutural, é a aumentada taxa de proteólise. A proteólise total foi avaliada por meio da liberação de tirosina no meio de incubação na presença de ciclohexamida, para bloquear processo de síntese protéica. Portanto, a concentração de tirosina no meio de incubação refletiria a taxa de quebra de proteína total (BAVIERA, *et al.*, 2008; GOLDSPINK, 1977; TAILLANDIER, *et al.*, 1996; GOODMAN, MCELANEY, RUDERMAN, 1981). A partir disto, investigamos se na dose e tempo utilizado haveria efeito anabólico do HMB sobre a musculatura esquelética em estado de atrofia, pois o HMB tem efeito anti-proteolítico (NISSEN, *et al.*, 1996; NISSEN; ARUMBAD, 1997; WILSON, WILSON, MANNINEN, 2008). Interessantemente, o procedimento de imobilização, ao contrário do que esperávamos, não aumentou a proteólise na musculatura esquelética imobilizada. Estudo de atrofia muscular induzida pelo desuso a partir da imobilização da pata posterior, demonstrou que a síntese protéica estava diminuída em seis horas após a imobilização, e um maior decréscimo na síntese protéica ocorreu com o aumento do período de tempo de imobilização (GOLDSPINK, 1977). As mudanças na proteólise foram mais lentas do que as mudanças na síntese no início da imobilização do músculo sóleo (GOLDSPINK, 1977). Depois de dois dias, a proteólise estava aumentada, quando esta foi expressa por mg de músculo, porém, quando esta era expressa pelo peso total do músculo, a taxa de degradação protéica estava diminuída, indicando que o percentual de perda de peso excede o percentual de aumento na proteólise (GOLDSPINK, 1977). Como não investigamos

a síntese protéica no músculo esquelético, não podemos descartar esta possibilidade, contudo demonstramos que ao sétimo dia, a proteólise, expressa por nmol de tirosina por mg de músculo, ao final de duas horas de incubação, não estava significativamente aumentada. Isto dá um indicativo que devemos investigar a síntese protéica o que talvez ajude a entender o fenômeno. Investigações em humanos sobre o *turnover* protéico em situação de desuso relataram que a variável primária que muda e auxilia na perda de massa muscular é a redução da síntese protéica, a qual nestes indivíduos se encontrava diminuída tanto no estado pós-absortivo quanto no pós-prandial, enquanto que a proteólise muscular parece não se alterar (PHILLIPS, GLOVER, RENNIE, 2009). Existem estudos demonstrando que a atrofia muscular induzida pelo desuso, ao menos nos períodos iniciais ocorrem por diminuição da síntese protéica ao invés de aumento da proteólise e, que após esta fase inicial, a proteólise passa a ser determinante para o processo de atrofia muscular (figura 28) (THOMASON, BIGGS, BOOTH, 1989; THOMASON, BOOTH, 1990).

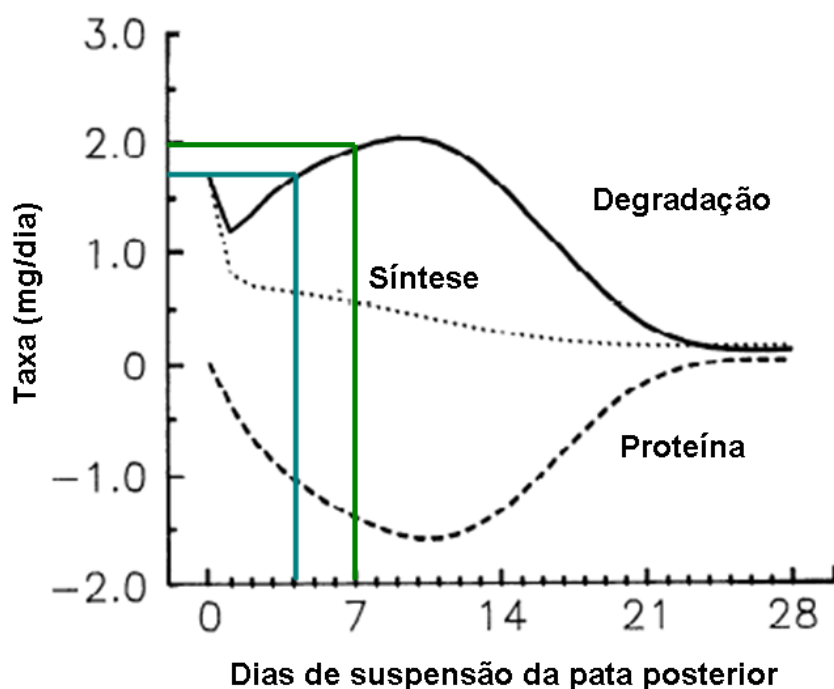


FIGURA 28 – Taxa de síntese e degradação estimada no sóleo a partir do modelo de suspensão da cauda. A figura demonstra que ao dia 0 de suspensão da pata posterior, os animais não apresentam perda no conteúdo de proteína miofibrilar, contudo, ao segundo dia, a perda de proteína (atrofia muscular) era decorrente de

uma queda na síntese protéica ao invés de um aumento na proteólise, e isto persistiu até o quarto dia. Somente ao sétimo dia a atrofia era decorrente tanto de uma queda da síntese protéica quanto de um aumento da proteólise. A linha azul demonstra que ao quarto dia de suspensão da pata posterior, a proteólise retorna aos valores basais, e a linha verde, demonstra que somente ao sétimo dia a proteólise se eleva (adaptada de THOMASON, BIGGS, BOOTH, 1989).

Informações sobre síntese e degradação protéica estão explicitadas na Figura 28. Em sete dias do modelo de baixa exposição a sobrecarga na musculatura esquelética, a síntese protéica diminui, e foi determinante para a atrofia muscular (THOMASON, BIGGS, BOOTH, 1989). Em adição, a proteólise diminuiu nos períodos iniciais de atrofia muscular, e que somente no quarto dia, ocorreu equivalência em relação aos valores iniciais (THOMASON, BIGGS, BOOTH, 1989). Apesar do estudo não demonstrar, pode-se postular que a diferença entre o quarto e o sétimo dia não é grande o suficiente para ser significativa. Nossos resultados corroboram estes achados porém, apesar de serem modelos caracterizados como, modelos de atrofia muscular induzida pelo desuso, metodologicamente são modelos diferentes um do outro, mas mecanicamente idênticos.

Homens jovens submetidos à imobilização da perna, devido a uma fratura, apresentaram grande redução da síntese protéica (GIBSON, *et al.*, 1987; GIBSON, *et al.*, 1988). Estes autores sugerem que a queda da proteólise, que acompanhava a queda da síntese protéica, poderia ser uma mudança adaptativa, pois se isso não ocorresse, a atrofia ocorreria numa velocidade muito maior do que comumente ocorre (GIBSON, *et al.*, 1987). A queda na síntese protéica no período pós-prandial, fenômeno conhecido como resistência anabólica pode ser acompanhada por uma diminuída proteólise (GLOVER, *et al.*, 2008; PHILLIPS, GLOVER, RENNIE, 2009). A imobilização unilateral do joelho em humanos jovens e saudáveis diminui significativamente a síntese protéica miofibrilar no quadríceps no estado pós-absortivo (GLOVER, *et al.*, 2008). A infusão de baixa e alta dose de aminoácidos (43 e 261 mg.kg⁻¹.h⁻¹), não aboliu os efeitos da imobilização sobre a atrofia muscular, demonstrando que nesta situação, os indivíduos encontravam-se em resistência anabólica a infusão de aminoácidos (GLOVER, *et al.*, 2008). Assim, a maior perda da massa muscular na atrofia pela imobilização parece ser decorrente da queda da síntese protéica.

Humanos treinados, que realizaram em média sete horas de treinamento de força, semanalmente, por 28 dias, juntamente com a suplementação de 0, 3, ou 6 gramas de HMB diariamente, não obtiveram redução significativa dos marcadores de lesão muscular, massa corporal gordurosa, aumento de massa magra ou performance no levantamento de peso (teste de 1 repetição máxima) (KREIDER, *et al.*, 1999). Outros estudos têm também relatado resultados similares (HEWITT, *et al.*, 2006; SLATER, *et al.*, 2001; WILSON, *et al.*, 2009; PADDON-JONES, KEECH, JENKINS, 2001). No estudo atual, foi verificado que a imobilização do membro resulta em diminuição do peso muscular, da área de secção transversa das fibras musculares e causa lesões nos sarcômeros dos músculos atrofiados, sendo esta última, um marcador direto de lesão muscular. Além do mais, a suplementação com HMB não foi capaz de atenuar estas alterações decorrentes da atrofia, resultados que estão de acordo com os estudos publicados previamente, nos quais, também demonstraram que o HMB não altera os indicadores indiretos de lesão muscular (HEWITT JENNIFER, *et al.*, 2006; SLATER, *et al.*, 2001; WILSON, *et al.*, 2009; PADDON-JONES, KEECH, JENKINS, 2001).

Para confirmar se os resultados obtidos nos ensaios realizados estavam corretos e demonstrar que não ocorreram erros técnicos, foi realizado outros ensaios utilizando ratos jovens Wistar (~120g), submetidos a um jejum de 48 horas e suplementados com HMB durante este mesmo período. Encontramos após 48 horas de jejum, que o sóleo dos animais dos grupos suplementados com HMB ou não, não apresentavam aumento na proteólise total. Interessantemente o músculo EDL, que é um músculo rico em fibras do tipo II, dos animais submetidos ao jejum suplementados ou não com HMB, apresentaram aumento na proteólise total quando comparados ao EDL dos animais do grupo alimentado. O aumento na proteólise total verificado para o músculo EDL nos permite confirmar que os dados dos ensaios estavam corretos e não eram artefatos de técnica. Além do mais, sugerem que pelo menos no jejum de 48 horas, existe uma diferença na proteólise para músculos de diferentes composições predominantes de fibras musculares, com o EDL sofrendo uma maior proteólise em comparação ao sóleo, músculo rico em fibras do tipo I. Tem sido demonstrado que ratos Wistar jovens, quando submetidos ao jejum de 48 horas, apresentam uma diminuição da síntese protéica nas primeiras 24 horas tanto no sóleo como no EDL (LI; GOLDBERG, 1976). No entanto, a proteólise foi maior no segundo dia para o EDL quando comparado ao sóleo e as maiores mudanças na

síntese e degradação no EDL quando comparados ao sóleo, podem conferir ao EDL uma maior perda de peso em relação ao sóleo (LI; GOLDBERG, 1976). Parece que a atrofia induzida pelo jejum ocorre devido aos aumentos nas concentrações de cortisol e diminuições das concentrações de insulina (GOLDBERG; GOODMAN, 1969). Além do mais, utilizam-se na maioria dos estudos os músculos brancos como o EDL, porque estes músculos são mais sensíveis aos glicocorticóides do que os músculos vermelhos, como o sóleo (GOLDBERG; GOODMAN, 1969). Estes achados ajudam a explicar os resultados obtidos no presente estudo, o qual demonstrou que a proteólise encontrava-se aumentada após 48 horas de jejum no EDL quando comparada à do sóleo. Foi verificado também, que a suplementação com HMB não atenuou a proteólise observada no EDL dos animais submetidos ao jejum, quando comparado aos animais do grupo placebo e do grupo alimentado. Foi relatado que em músculo EDL obtidos de animais submetidos a jejum de 48 horas, a presença de 10 mM de leucina no meio de incubação, não atenuou os efeitos proteolíticos do jejum (BUSQUETS, *et al.*, 2002). No entanto, não é possível postular que o jejum possa ser tão estressante quanto à imobilização para induzir resistência anabólica, apenas que a suplementação com HMB não foi capaz de atenuar a proteólise muscular nestes indivíduos.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas na musculatura esquelética inativa, assim como na musculatura esquelética submetida ao esforço físico (POWERS, *et al.*, 2010). Quando a produção de EROs na célula excede a capacidade de eliminar estes oxidantes, o estresse oxidativo ocorre. Um estado pró-oxidante nas células pode alterar a estrutura e função das proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, resultando em lesão celular, e, em circunstâncias extremas morte celular (POWERS, KAVAZIS, MCCUNG, 2007). Os primeiros radicais gerados nas células são o ânion superóxido e o óxido nítrico e, ambos podem ativar uma variedade de sinalização celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007 apud POWERS, *et al.*, 2010). O ânion superóxido é gerado pela adição de um elétron ao oxigênio no estado molecular, e isto pode ocorrer via transferência de um elétron na mitocôndria e por muitos sistemas enzimáticos localizados nas células (POWERS, *et al.*, 2010). Especialmente, a produção de ânion superóxido, pode ocorrer em muitos locais na musculatura esquelética, incluindo mitocôndria, retículo sarcoplasmático, túbulos transversos, sarcolema e citosol (POWERS, *et al.*, 2010), figura 29.

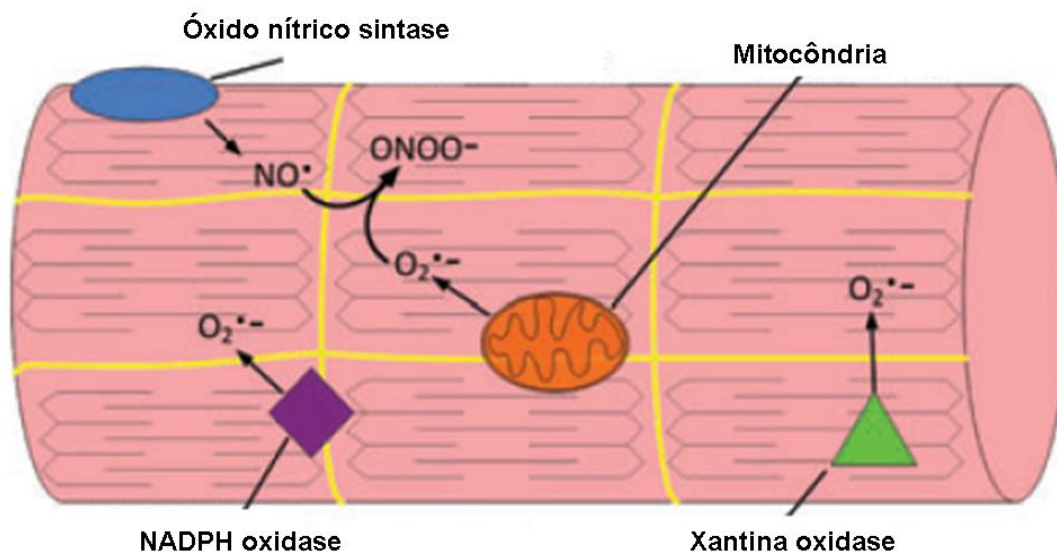


FIGURA 29 – Ilustração das potenciais fontes de produção de EROs na musculatura esquelética. Note que o anion superóxido pode ser produzido em muitos sítios na fibra muscular, incluindo, NADPH oxidase, xantina oxidase e mitocôndria. Óxido nítrico (NO^\bullet), anion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido nitrito (ONOO^-) (adaptado de POWERS, *et al.*, 2010).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical e é um fraco oxidante, com meia vida relativamente longa, e esta longa meia vida permite sua difusão nas células e passagem através das membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007 apud POWERS, *et al.*, 2010). Além do mais, o H_2O_2 reage com diferentes moléculas na célula e pode ativar uma variedade de vias de sinalização (POWERS, *et al.*, 2010). Coletivamente, estas propriedades tornam o H_2O_2 importante molécula de sinalização das EROs na célula (VEAL, *et al.*, 2007). Estudos iniciais mostraram que a atrofia induzida por imobilização da musculatura esquelética estava associada com a aumentada produção de radicais livres de oxigênio, resultando em lesão oxidativa nas fibras musculares inativas (KONDO, *et al.*, 1992; KONDO, NISHINO, ITOKAWA, 1994). Como mencionado anteriormente, a PKR está envolvida na formação EROs (ELEY, *et al.*, 2008), e a formação de EROs parece ser o mecanismo chave da atrofia muscular induzida pelo desuso (POWERS, KAVAZIS, MCCCKUNG, 2007). Contudo, quando se expõe as linhagens de células C2C12 em meio de cultura ao $\text{TNF-}\alpha$ ou angiotensina II, um aumento na proteólise por meio da ativação da PKR. Após 30 minutos de exposição existe um aumento na produção de Eros, o qual resulta na ativação das caspases-3 e -8. Ao colocar neste meio de

cultura o HMB (50 μ M), este tem a capacidade de atenuar a ativação da PKR (ELEY, *et al.*, 2008), e conseqüentemente, a formação de EROs. Neste sentido, se o HMB atenuar a ativação da PKR e conseqüentemente a formação de EROs, ele poderia atenuar a atrofia muscular em músculos que são submetidos a um procedimento que resulte em atrofia.

No presente estudo, a atrofia muscular induzida pela imobilização elevou significativamente a produção de lipoperóxidos na musculatura esquelética dos ratos suplementados ou não com HMB. Porém, diferentemente do que se esperava, a suplementação com HMB não atenuou a produção de lipoperóxidos dos músculos atrofiados. Estes resultados novamente contrariam a hipótese inicial do estudo, a qual sugeriu que a suplementação com HMB atenuaria a atrofia muscular induzida pela imobilização, assim como os marcadores da atrofia muscular.

O NF- κ B representa uma família de cinco fatores de transcrição (p65 ou Rel A, Rel B, c-Rel, p52 e p50), nos quais medeiam uma variedade de processos dependendo do tipo célula e dos seus respectivos ativadores (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). Exemplos incluem os efeitos sobre apoptose, imunidade e inflamação, e, desenvolvimento e diferenciação celular (BALDWIN, 1996). Existem muitas evidencias de estudos *in vitro*, modelos experimental animal e de doenças em humanos, sugerindo que a ativação do NF- κ B pode levar a atrofia muscular (LI; MALHOTRA; KUMAR, 2008). Foi relatado perda de massa muscular através da proteólise dependente do proteassoma, pois a expressão da ubiquitina ligase MuRF1, estava aumentada em ratos com a forma constitutivamente ativa do MIKK, uma quinase específica do músculo para a IKK (CAI, *et al.*, 2004). Isto mostra que existe ligação entre a via do NF- κ B com a via da ubiquitina proteassoma ATP-dependente. Por outro lado, o cultivo de miotúbulos C2C12 na presença de HMB inibiu a PKC α e conseqüentemente diminui a atividade e a expressão de componentes do sistema ubiquitina proteassoma ATP-dependente (SMITH, WYKE, TISDALE, 2004). Em estudo posterior, os mesmo autores demonstraram haver diminuição da expressão das subunidades alfa e beta da estrutura 20S e da proteína p42 da estrutura 19S do complexo 26S do proteassoma, após a suplementação com HMB (SMITH, WYKE, TISDALE, 2005). Como todos os membros da família do NF- κ B são expressos na musculatura esquelética (HUNTER, *et al.*, 2002), e devido ao seu envolvimento na atrofia muscular, verificar quais os efeitos da suplementação com HMB sobre a atrofia muscular e do fator de transcrição chave da atrofia

muscular é essencial, pois, o HMB poderia ser utilizado como medida terapêutica atenuadora contra a perda de massa muscular. No presente estudo, a expressão do conteúdo total da subunidade p65 do NF- κ B não diferiu significativamente entre os músculos imobilizados e não imobilizados dos grupos suplementados ou não com HMB. Neste sentido, pode-se sugerir que a subunidade p65 do NF- κ B, apesar de presente na musculatura esquelética, não está envolvida com a atrofia muscular induzida pela imobilização durante sete dias de imobilização. É provável também, que a não observação de alteração desta subunidade seja decorrente do período de tempo de exposição a imobilização do membro. Outro resultado diferente do esperado é o efeito da suplementação com HMB sobre a expressão do NF- κ B, pois, esperava-se que o HMB diminuísse a expressão deste fator de transcrição, como foi demonstrado em outros estudos (SMITH, WYKE, TISDALE, 2004; SMITH, WYKE, TISDALE, 2005; ELEY *et al.*, 2007). Como demonstrado anteriormente, os resultados dos estudos envolvendo a suplementação com HMB são contraditórios, e, se o HMB realmente diminui a expressão do NF- κ B, talvez estes diferentes resultados possam ser decorrentes do modelo experimental utilizado para induzir atrofia muscular, ou, do período de tempo de suplementação com HMB e, até mesmo da dose de HMB utilizada nos estudos.

Em resposta ao diminuído uso, a musculatura esquelética sofre um remodelamento redutivo adaptativo (STEIN; WADE, 2005) demonstrando que o perfil do fenótipo metabólico mensurado pelas atividades das enzimas lactato desidrogenase e da citrato sintase (VERMAELEN, *et al.*, 2007) está alterado. Pouco se sabe sobre as conseqüências metabólicas associadas com a atrofia induzida pelo desuso, sobre o produto destas enzimas. No presente estudo, o fenótipo metabólico da musculatura esquelética foi avaliado indiretamente pela produção basal de lactato. A atrofia muscular elevou significativamente a produção de lactato pela musculatura esquelética imobilizada em comparação à não imobilizada. Em outros estudos, foi demonstrada alteração fenotípica na musculatura esquelética sujeita a suspensão da pata posterior, o qual diminui a proporção de fibras do tipo I, e aumentou a proporção de fibras híbridas do tipo I e do tipo IIa no sóleo (DESPLANCHES, *et al.*, 1987). Além do mais, este modelo de atrofia muscular leva a mudança na cadeia pesada (MHC) de miosina lenta para rápida, demonstrando que a proporção da isoforma IIa da MHC eleva-se no sóleo (MCDONALD; FITTS, 1993; THOMASON; HERRICK; BADWIN, 1987).

Tem sido demonstrado previamente que a imobilização do membro posterior durante cinco dias, não alterou a atividade da enzima citrato sintase ou a expressão da isoenzima lactato desidrogenase entre os músculos controle e imobilizados tanto do sóleo quanto do músculo plantar (VERMAELEN, *et al.*, 2007). Porém, tem estudo demonstrando que a suspensão da pata posterior durante 4 semanas reduz em 40% a atividade da citrato sintase juntamente com uma mudança nas isoformas da MHC lenta para rápida (DUBOUCHAUD, *et al.*, 1996). Com a realização da atividade contrátil, as fibras do tipo I dos animais submetidos a suspensão da pata posterior durante duas semanas mostraram uma maior utilização de glicogênio e maior acúmulo de lactato quando comparado com as fibras do tipo I controle (GRICHKO, *et al.*, 2000). Estes achados estão de acordo com os encontrados aqui, o qual mostrou que a produção de lactato basal eleva-se nos músculos atrofiados submetidos a imobilização da pata posterior. Assim, os resultados obtidos no presente estudo poderiam indicar uma alteração de um fenótipo lento para um fenótipo rápido, pois as fibras musculares rápidas contêm maior capacidade glicolítica, diferente das lentas, nos quais possuem maior capacidade oxidativa.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Parece existir apenas um estudo que verificou o efeito da suplementação com HMB sobre a proteólise total, o qual encontrou efeito anti-catabólico somente com altas doses (SMITH, WYKE, TISDALE, 2005). Portanto, nós não podemos descartar a possibilidade de altas doses exercerem efeito anti-catabólico em modelo de atrofia por imobilização, mas isso precisa ser testado.

O tempo de suplementação também parece exercer efeito anti-catabólico em doses fisiológicas, contudo, isto ainda não foi avaliado em modelo de atrofia muscular induzida por imobilização, servindo de sugestão para estudos posteriores.

Por fim, não avaliar a síntese protéica juntamente com a proteólise é uma limitação do estudo, pois isto confirmaria se a atrofia muscular induzida pela imobilização durante sete dias é decorrente realmente de uma queda da síntese protéica.

8. CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo principal verificar quais os efeitos da suplementação com HMB sobre a atrofia muscular induzida pelo desuso. Nós hipotetizamos que a suplementação com HMB atenuaria a atrofia muscular e alguns marcadores envolvidos com a atrofia muscular.

Foi verificado por meio do peso muscular, área de secção transversa, análise ultra-estrutural dos sarcômeros e de proteólise total, que a suplementação com HMB não apresenta propriedade anti-catabólica na dose e tempo testados. Também foi verificado que na dose e tempo testados, a suplementação com HMB não foi capaz de alterar alguns marcadores envolvidos na atrofia muscular induzida pela imobilização como: estresse oxidativo por meio da lipoperoxidação, expressão protéica do conteúdo total do NF-kB, e, alteração do fenótipo metabólico.

Diante disto, a suplementação com HMB não apresentou propriedade anti-catabólica no modelo experimental utilizado no estudo atual e não foi capaz de alterar os marcadores envolvidos na atrofia muscular.

Por fim, a falta de elevação na proteólise total na atrofia dos músculos induzida pela imobilização de sete dias, pode ser uma indicativa, de que, os músculos estão se atrofiando devido a uma diminuição da síntese protéica.

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, G.R. Invited review: Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. **Journal of Applied Physiology**, United States, v. 93, n. 3, p. 1159-1167, 2002.

ADAMS, G. R.; CHENG, D. C.; HADDAD, F.; BALDWIN, K. M. Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening and shortening training bouts of equivalent duration. **Journal of Applied Physiology**, United States, v. 96, n. 5, p. 1613-1618, 2004.

ALKNER, B.A.; TESCH, P.A. knee extensor and plantar flexor muscle size and function following 90 days of bed rest with or without resistance exercise. **European journal of applied physiology**, Germany, v. 93, n. 3, 294-305, 2004.

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBAL, S.R.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. **The Journal of Nutrition**, United States, v. 130, n. 2, p. 139-145, 2000.

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBAL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling Pathways Involved in Translational Control of Protein Synthesis in Skeletal Muscle by Leucine¹. **The Journal of Nutrition**, United States, v. 131, n. 3, p. 856S–860S, 2001.

ANTHONY, J.C.; LANG, C.H.; CROZIER, S.J.; ANTHONY, T.G., MACLEAN, D.A.; KIMBAL, S.R.; JEFFERSON, L. S. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, United States, v. 282, n. 5, p.E1092–E1101, 2002.

ANSVED, T. Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. **Acta physiologica Scandinavica**, England, v. 154, n. 3, p. 291-302, 1995.

AOKI, M.S.; LIMA, W.P.; MYYABARA, E.H.; GOUVEIA, C.H.A.; MORISCOT, A.S. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. **Clinical nutritional**, England, v. 23, n. 5, p. 1176-1183, 2004.

BAAR, K.; NADER, G.; BODINE, S. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. **Essays in Biochemistry**, England, vol. 42, p. 42-61-74, 2006.

BAR-SHAI, M.; CARMELI, E.; COLEMAN, R.; ROZEN, N.; PEREK, S.; FUCHS, D.; REZNICK, A. Z. The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase, metalloproteinases and nuclear factor-kappaB in muscles of young and old rats. **Mechanisms of ageing and development**, Ireland, v. 126, n. 2, p. 289-297, 2005.

BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, United States, v. 75, p. 19-37, 2006.

BAVIERA, A.M.; ZANON, N.M.; NAVEGANTES, L.C.C.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Chemical sympathectomy further increases muscle protein degradation of acutely diabetic rats. **Muscle and nerve**, United States, v. 38, n. 2, p. 1027-1035, 2008.

BALDWIN, A.S. Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annual review of immunology**, United States, v. 14, p. 649-683, 1996.

BELIZARIO, J.E.; LORITE, M.J.; TISDALE, M.J. Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, England, v. 84, n. 8, p. 1135–1140, 2001.

BODINE, S.C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V.K.; NUNEZ, L.; CLARKE, B.A.; e colaboradores. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, United States, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.

BODINE, S.C.; STITT, T.N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W.O.; STOVER, G.L.; BAUERLEIN, R.; et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, England, v. 3, n. 11, p. 1014-1019, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, United States, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M.J.; LIN, M.Z.; JUO, P.; HU, L.S.; ANDERSON, M.J.; ARDEN, K.C.; BLENIS, J.; GREENBERG, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, United States, v. 96, n. 6, p. 857-868.

BUSE, M. G.; SANDRA, R. Leucine: a possible regulator of protein turnover in muscle. **The journal of clinical investigation**, United States, v. 56, n. 5, p. 1250-1261, 1975.

BUSQUETS, S.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Branched-chain amino acids: A role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? **Journal of cellular physiology**, United States, v. 191, n. 3, p. 283-289, 2002.

CAI, D.; FRANTZ, J.D.; TAWA, N.E. Jr.; MELENDEZ, P.A.; OH, B.C.; LIDOV, H.G.; HASSELGREN, P.O.; FRONTERA, W.R.; LEE, J.; GLASS, D.J. IKK β -NF-kB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**, United States, v. 119, n. 2, p. 285–298, 2004.

CALDER, P.C. Branched-chain amino acids and immunity. **The Journal of nutrition**, United States, 136(1 Suppl), 288S-293S, 2006.

CARON, A. Z.; DROUIN, G.; DESROSIERS, J.; TRENSZ, F.; GRENIER, G. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. **Journal Applied of physiology**, United States, v. 106, p. 2049-2059, 2009.

CHIN, E.R. The role of calcium and calcium/calmodulina-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. **The Proceedings of the Nutrition Society**, England, v. 62, n. 2, p.279-286, 2004.

CLARK, R.H.; FELEKE, G.; DIN, M.; YASMIN, T.; SINGH, G.; KHAN, F.A.; RATHMACHER, J.A. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 24, v. 3, p. 133-139, 2000.

COMBARET, L.; DARDEVET, D.; RIEU, I.; POUCH, M. N.; BÉCHET, D.; TAILLANDIER, D.; GRIZARD, J.; ATTAIX, D. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. **Journal of physiology**, England, n. 569, v. pt2, p. 489-499, 2005

COUTINHO, E.L.; GOMES, A.R.; FRANÇA, C.N.; SALVINI, T.F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, Brasil, v. 35, n. 11, p. 1329-1332, 2002.

COOLICAN, S.A.; SAMUEL, D.S.; EWTON, D.Z.; MCWADE, F.J.; FLORINI, J.R. The Mitogenic and Myogenic Actions of Insulin-like Growth Factors Utilize Distinct Signaling Pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 272, n. 10, p. 6653-6662, 1997.

CROZIER, S. J.; KIMBALL, S. R.; EMMERT, S. W.; ANTHONY, J. C.; JEFFERSON, L. S. Oral Leucine Administration Stimulates Protein Synthesis in Rat Skeletal Muscle. **The Journal of Nutrition**, United States, v. 135, p. 376–382, 2005.

CUSCHIERI, J.; MAIER, R.V. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). **Critical care medicine**, United States, v. 33, n. 12, S417-S419, 2005

DESPLANCES, D.; MAYET, M.H.; SEMPORE, B.; FRANDROIS, R. Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. **Journal applied of physiology**, United States, v. 65, n. 2, p. 558-563, 1987.

DRISKELL, J. A. Sports Nutrition, Fats and Proteins. Taylor & Francis Group; New York, USA, 2007.

DOUCET, M.; RUSSELL, A.P.; LÉGER, B.; DELBIGARÉ, R.; JOANISSE, D.R.; CARON, M.A.; LEBLANC, P.; MALTAIS, F. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, United States, v. 176, n. 3, p. 261-269, 2007.

DU, J.; WANG, X.; MEIRELES, C.; BAILEY, J.L.; DEBIGARE, R.; ZHENG, B.; PRICE, S.R.; MITCH, W.E. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. **The Journal of Clinical Investigation**, United States, v. 113, n. 1, p. 115-123, 2004.

DUBOUCHAUD, H.; GRANIER, P. MERCIER, J.; LE PEUCH, PREFAUT, C. Lactate uptake by skeletal muscle sarcolemmal vesicles decreases after 4 wk of hindlimb unweighting in rats. **Journal applied of physiology**, United States, v. 80, n. 2, p. 416-421, 1996.

EDSTRÖM, E.; ALTUN, M.; HÄGGLUND, M.; ULFHAKE, B. Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, United States, v. 61, n. 7, p. 663-674, 2006.

ELEY, H.L.; RUSSEL, S.T.; BAXTER, J.H.; MUKERJI, P.; TISDALE, M.J. Signaling pathways initiated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, United States, v. 293, n. 4, p. E923-E931, 2007.

ELEY, H.L.; RUSSEL, S.T.; TISDALE, M.J. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor-(alpha) and angiotensin II by (beta)-hydroxy-(beta)-methylbutyrate. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, United States, v. 295, n. 6, p. E1417-E1426, 2008.

ENGLE, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline Hydrazine buffers, improved conditions of L-glutamate, L-Lactate, and other metabolites. **Annals of Biochemistry**, United States, v. 88, n. 2, p. 475-484, 1978.

FITTS, R.H.; RILEY, D.R.; WIDRICK, J.J. Physiology of a microgravity environment. Invited review: microgravity and skeletal muscle. **Journal Applied of Physiology**, United States, v. 89, n. 2, p. 823-839, 2000.

FLÜCK, M.; HOOPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity: from gene to form and function. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, Germany, v. 146, p. 159-216, 2003.

FURUYAMA, T.; KITAYAMA, K.; YAMASHITA, H.; MORI, N. Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. **The biochemical journal**, England, v. 375, n. Pt 2, p. 365-371, 2003.

GALLAGHER, P.M.; CARRITHERS, J.A.; GODARD, M.P.; SHULZE, K.E.; TRAPPE, S.W. β -hydroxy- β -methylbutyrate ingestion, Part I: effects of strength and fat free mass. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. United States, v.32, n.12, p. 2109-2115, 2000a.

GALLACHER, P.M.; CARRITHERS, J.A.; GODARD, M.P.; SCHULZE, K.E.; TRAPPE, S.W. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate ingestion, part II: effects on hematology, hepatic and renal function. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. United States, v. 32, n. 12, p. 2116-2119, 2000b.

GLASS, D.J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The international journal of biochemistry and cell biology**, England, v. 37, n. 10, p. 1974-1984, 2005.

GIBSON, J.N.; HALLIDAY, D.; MORRISON, W.L.; STOWARD, P.J.; HORNSBY, G.A.; WATT, P.W.; MURDOCH, G.; RENNIE, M.J. Decrease in human quadriceps muscle protein turnover consequent upon leg immobilization. **Clinical science** (London), England, v. 72, n. 4, p. 503-509, 1987.

GIBSON, J.N.; SMITH, K.; RENNIE, M.J. Prevention of disuse muscle atrophy by means of electrical stimulation: maintenance of protein synthesis. **Lancet**, v. 2, n. 8614, p. 767-770, 1988.

GLICKMAN M.H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological Reviews**, United States, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; LI, H.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system. **Physiological reviews**, United States, v. 83, n. 3, p. 731-801, 2003.

GOLDBERG, A.L.; GOODMAN, H.M. Relationship between cortisone and muscle work in determining muscle size. **The journal of physiology**, England, v. 200, n. 3, p. 667-675, 1969.

GOLDSPINK, D.F. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. **The journal of physiology**, England, v. 264, n. 1, p. 267-282, 1977.

GOMES, M.D.; LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A.L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 98, n. 25, p. 14440-14445, 2001.

GOMES, A.R.; COUTINHO, E.L.; FRANÇA, C.N.; POLONIO, J.; SALVINI, T.F. Effect of one stretch a week applied on rat muscle fiber morphology. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, Brasil, v. 37, n. 12, p. 1853-1861, 2004.

GOODMAN, M.N.; MCELANEY, M.A.; RUDERMAN, N.B. Adaptation to prolonged starvation in the rat: curtailment of skeletal muscle proteolysis. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, United States, v. 241, n. 4, p. E321-E327, 1981.

GLOVER, E.I.; PHILLIPS, S.M.; OATES, B.R.; TANG, J.E.; TARNOPOLSKY, M.A.; SELBY, A.; e colaboradores. Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. **The journal of physiology**, England, v. 586, n. pt 24, p. 6049-6061, 2008.

GRIFFIN, G.E.; WILLIAMS, P.E.; GOLDSPINK, G. Region of longitudinal growth in striated muscle fibres. **Nature: New Biology**, England, v. 232, n. 27, p. 28-29, 1971.

GRICHKO, V.P.; HEYWOOD-COOKSEY, A.; KIDD, K.R.; FITTS, R.H. Substrate profile in rat soleus muscle fibers after hindlimb unloading and fatigue. *Journal applied of physiology*, United States, v. 88, n. 2, p. 473-478, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. 2007 in: POWERS, S.K.; DUARTE, J.; KAVAZIS, A.N.; TALBERT, E.E. Reactive oxygen species are signaling molecules for skeletal muscle adaptation. *Experimental physiology*, England, v. 95, n. 1, p. 1-9, 2010.

HARJOLA, V.; JÄNKÄLÄ, H.; HÄRKÖNEN, M. Myosin heavy chain mRNA and protein distribution in immobilized rat skeletal muscle are not affect by testosterone status. **Acta physiologica Scandinavica**, England, v. 169, n. 4, p. 277-282, 2000.

HERSHEY, J.W. Translational control in mammalian cells. **Annual Review of Biochemistry**, United States, v. 6, p. 717-755, 1991.

HEWITT-JENNIFER, A.; NUNAN, D.; HOWATSON, G.; SOMEREN, A.; KEN, A.; WHYTE; GREGORY, P. HMB and KIC Supplementation Does Not Reduce Signs and Symptoms of Exercise-Induced Muscle Damage. **Medicine and science in sports and exercise**, United States, v. 38, n. 5, p. S401, 2006.

HIGAKI, Y.; MIKAMI, T.; FUJII, N.; HIRSHMAN, M.F.; KOYAMA, K.; SEINO, T. TANAKA, K.; GOODYEAR, L.J. Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, United States, v. 294, n. 5, p. E889-E897, 2008.

HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H.; YASUHARA, S.; MARTYN, J. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. . **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, United States, v. 279, n. 6, p. E1235-E12141, 2000.

HOFFMAN, E. P.; NADER, G. A. Balancing muscle hypertrophy and atrophy. **Nature medicine**, United States, v. 10, n. 6, p. 584-585, 2004.

HUNTER, R.B.; STEVERSON, E.; KONCAREVIC, A.; MITCHELL-FELTON, H.; ESSING, D.A.; KANDARIAN, S.C. Activation of an altetRNAive NF-KB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. **The FASEB Journal**, United States, v. 16, n. 6, p. 529-538, 2002.

HU, Z.; WANG, H.; LEE, I.H.; DU, J.; MITCH, W.E. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. **The Journal of clinical investigation**, United States, v. 119, n. 10, p. 3059-3069, 2009.

ISHIHARA, A.; ROY, R.R.; OHIRA, Y.; IBATA, Y.; EDGERTON, V.R. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. **Journal of Applied Physiology**. United States. v. 84, n.6, p. 2183-2189, 1998.

JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **American Journal of Physiology, Cell Physiology**, United States, v. 287, n. 4, p. C834-C843, 2004.

JÓWKO, E.; OSTASZEWSKI, P.; JANK, M.; SACHARUK, J.; ZIENIEWCZ, A.; WILCZAK, J.; NISSEN, S. Creatine and β -Hydroxy- β -Methylbutyrate (HMB) additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. **Nutrition**, United States, v. 17, n. 7-8, p. 558-566, 2001.

JUDGE, A.R.; KONCAREVI, A.; HUNTER, R.B.; LIOU, H.C.; JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C. Role for I κ B α , but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. **American journal of physiology. Cell physiology**, United States, v. 292, n. , p. C372-382, 2007.

KABE, Y.; ANDO, K.; HIRAO, S.; YOSHIDA, N.; HANDA, H. Redox regulation of NF- κ B activation: Distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. **Antioxidants & Redox Signaling**, United States, v. 7, n. 3-4, p. 395-403, 2005.

KAMEI, Y.; MIURA, S.; SUZUKI, M.; KAY, Y.; MIZUKMI, J.; TANAGUCHI, T.; Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 279, n. 39, p. 41114-41123, 2004.

KANDARIAN, S.C.; JACKMAN, R.W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. **Muscle Nerve**, United States, v. 33, n. 2, p. 155-165, 2006.

KANDARIAN, S.C.; STEVENSON, E.J. Molecular Events in Skeletal Muscle During Disuse Atrophy. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, United States, v. 30, n.3, p. 111-116, 2002.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, United States, v.27, p.137-138, 1965.

KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, United States, v. 4, p.39-43, 2001.

KOHLMEIER, M. **Nutrient metabolism**, Elsevier, California, USA, 2003.

KONDO, H.; MIURA, M.; ITOKAWA, Y. Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization. **FEBS Letters**, Netherlands, v. 349, n. 2, p. 169-172, 1994.

KONDO, H.; MIURA, M.; KODAMA, J.; ITOKAWA, Y. Role of iron in oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. **Pflügers Archiv: European journal of physiology**, Germany, v. 421, n. 2-3, p. 295-297, 1992.

KREIDER, R.B.; FERREIRA, M.; WILSON, M.; ALMADA, A.L. Effects of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation during resistance-training on markers of catabolism, body composition and strength. **International journal of sports medicine**, Germany, v. 20, n. 8, p. 503-509, 1999.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, England, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEBLANC, A.D.; SCHNEIDER, V.S.; EVANS, H.J.; ROWE, R.; SPECTOR, R. Regional changes in muscle mass following 17 weeks of bed rest. **Journal Applied of Physiology**, United States, v. 73, n. 5, p. 2172-2178, 1992.

LEEUEWENBURGH, C.; GURLEY, C.M.; STROTMAN, B.A.; DUPONT-VERSTEEGENDEN, E.E. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, United States, v. 288, n. 5, p. R1288-R1296, 2005.

LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEY, J.; PRICE, S.R.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States, v. 18, n. 1, p. 39-51, 2004.

LI, J.B.; GOLDBERG, A.L. Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscle. **The American journal of physiology**, United States, v. 231, n. 2, p. 441-448, 1976.

LI, H.; MALHOTRA, S.; KUMAR, A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. **J mol med**, v. 86, p. 1113-1126, 2008.

LYNCH, C. J.; PATSON, B. J.; ANTHONY, J.; VAVAL, A.; JEFFERSON, L. S.; VARY, T. C. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. **American journal of physiology, Endocrinology and metabolism**, United States, v. 283, p. E503–E513, 2002.

LOUGHNA P, GOLDSPIK G, GOLDSPIK DF. Effect of inactivity and passive stretch on protein turnover in phasic and postural rat muscles. **Journal Applied of Physiology**, United States, vol. 61, n.1, p. 173-179, 1986.

LOUARD, R. J.; BARRETT, E. J.; GELFAND, R. A. Overnight branched-chain amino acid infusion causes sustained suppression of muscle proteolysis. **Metabolism: clinical and experimental**, United States, v. 44, n. 4, p. 424-429, 1995.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of biophysical and biochemical cytology**, United States, v.9, p. 409-414, 1961.

MATSUZAWA, A.; ICHIJO, H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, United States, v. 7, n. 3-4, 2005.

MAY, P.E.; BARBER, A.; D'OLIMPIO, J.T.; HOURIHANE, A.; ABUMRAD, N.N. Reversal of cancer-related wasting using supplementation with a combination of beta-hidroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. **American Journal of Surgery**, United States, v. 183, n. 4, p. 471-479, 2002.

MCDONALD, K.S.; FITTS, R.H. Effect of hindlimb unweighting on single soleus fiber maximal shortening velocity and ATPase activity. **Journal applied of physiology**, United States, v. 74, n. 6, p. 2949-2957, 1993.

MITCH, W.E.; CLARK, A. S. Specificity of the effects of leucine and its metabolites on protein degradation in skeletal muscle. **The biochemical journal**, England, v. 222, n. 3, p. 579-586, 1984.

NAKASHIMA, K.; ISHIDA, A.; YAMAZAKI, M.; ABE, H. Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin-proteasome pathway in chick skeletal muscles. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v. 336, n. 2, p. 660-666, 2005.

NISSEN, S.L.; SHARP, R.; RAY, M.; RATHMACHER, J.A.; RICE, D.; FULLER, J.C.; CONNELLY, A.S.; ABUMRAD, N. Effect of leucine metabolite β -Hydroxy- β -Methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. **Journal of Applied Physiology**, United States, v. 81, n. 5, p. 2095-2104, 1996.

NISSEN, S. L.; ABUMRAD, N. N. Nutritional role of the leucine metabolite β -Hydroxy- β -Methylbutyrate (HMB). **The journal of nutritional biochemistry**, United States, v.8, p. 300-311, 1997.

NISSEN, S.; SHARP, R.L.; PANTON, L.; VUKOVICH, M.; TRAPPE, S.; FULLER, J.C. Jr. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. **The journal of nutrition**, United States, v. 130, n. 8, p. 1937-1945, 2000.

NISSEN, S.L.; SHARP, R.L. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. **Journal applied of physiology**, United States, v. 94 n. 2, p. 651-659, 2003.

NOUROOZ-ZADEH, Z.; TAJADDINI-SARMANDI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, United States, v. 220, n. 2, p. 403-409, 1994.

NUNES, E. A.; KUCZERA, D.; BRITO, G. A.; BONATTO, S.J.; YAMAZAKI, R. K.; TANHOFER, R.A.; MUND, R.C.; KRYCZYK, M.; FERNANDES, L.C. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor-kappaB expression. **Nutrition Research**, United States, 2008, v. 28, n. 7, p. 487-493, 2008.

NUNES, E.A.; FERNANDES, L.C. Atualizações sobre β -Hydroxy- β -Methylbutyrate: suplementação e efeitos sobre o catabolismo de proteínas. **Revista de Nutrição de Campinas**, Brasil, v. 21, n. 2, p. 243-251, 2008.

OSTASZEWSKI, P.; KOSTIUK, S.; BALASINSKA, M.; JANK, M.; PAPET, I.; GLOMOT, F. The leucine metabolite 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of laboratory rats and domestic chickens in vitro. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, Germany, v.84, p.1-8, 2000.

PADDON-JONES, D.; KEECH, A.; JENKINS, D. Short-term beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation does not reduce symptoms of eccentric muscle damage. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, United States, v. 11, n. 4, p. 442-450, 2001.

PANTANO, C.; REYNAERT, N.L.; VLIET, A.V., JANSSEN-HEININGER, Y.M. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, United States, v. 8, n. 9-10, p. 1791-1806, 2006.

PATEL, J.; MCLEOD, I.E.; VRIES, R.G.; FLYNN, A.; WANG, X.; PROUD, C.G. Cellular stress profoundly inhibit protein synthesis and modulates the states of phosphorylation of multiple translation factors. **European journal of biochemistry**, England, v. 269, p. 3076-3085, 2002.

PAVY-LE, TRAON A.; HEER, M.; NARICI, M.V.; RITTWEGER, J.; VERNIKOS, J. From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). **European journal of applied physiology**, Germany, v. 101, n. 2, p. 143-194, 2007.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS GIBSON, T.; XU B.E.; KARANDIKAR, M.; et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, United States, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001

PETERSON, A.L.; QURESHI, M. A.; FERKET, P.R.; FULLER, J.C. JR. Enhancement of cellular and humoral immunity in young broilers by the dietary supplementation of β -hydroxy- β -methylbutyrate. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, England, v. 21 n.2, p.307-330, 1999.

PEVIANI, S.M.; GOMES, A.R.; MOREIRA, R.F., MORISCOT, A.S., SALVANI, T.F. short bouts of stretching increase Myo-D, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. **Muscle & Nerve**, United States, v. 35, n. 3, p. 363-370, 2007.

PHILLIPS, S.M; GLOVER, E.I.; RENNIE, M.J. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. **Jornal Applied of Physiology**, United States, v. 107, n. 3, p. 645-654, 2009.

POWERS, S.K.; KAVAZIS, A.N.; MCCLUNG, J.M. Oxidative stress and disuse atrophy. **Jornal Applied of Physiology**, United States, v. 102, n. 6, p. 2389-2397, 2007.

POWERS, S.K.; DUARTE, J.; KAVAZIS, A.N.; TALBERT, E.E. Reactive oxygen species are signaling molecules for skeletal muscle adaptation. **Experimental physiology**, England, v. 95, n. 1, p. 1-9, 2010.

PROUD, C.G. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. **European Journal of Biochemistry**, England, v. 269, n. 22, p. 5338-5349, 2002.

QUI, M.; ELION, E.A. MAP kinase pathways. **Journal of Cell Science**, England, v. 118, n. 16, p. 3569-3572, 2005.

RASMUSSEN, B.B.; PHILLIPS, S.M. Contractile and nutritional regulation of human muscle growth. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, United States, v. 31, n. 3, p. 127-131, 2002.

REID, M.B. Redox modulation of skeletal muscle contraction: What we know and what we don't. **Journal Applied of Physiology**, United States, v. 90, n. 2, p. 724-731, 2001.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.

SABOURIN, P.J.; BIEBER, L.L. Purification and characterization of an alpha-ketoisocaproate oxygenase of rat liver. **The Journal of biological chemistry**, United States, Jul 10, v.257, n.13, p. 7460-7467, 1982.

SACHECK, J.M.; HYATT, J.P.; RAFFAELLO, A.; JAGOE, R.T.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States, v. 21, n. 1, p. 140-155, 2007.

SALAZAR, J.J.; MICHELE, D.E.; BROOKS, S.V. Inhibition of calpain prevents muscle weakness and disruption of sarcômero structure during hindlimb suspension. **Journal Applied of Physiology**, United States, v. 108, n. 1, p. 120-127, 2010.

SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C.; CALABRIA, E.; PICARD, A.; WALSH, K.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, United states, v. 117, n. 3, p. 399-412, 2004.

SANDRI, M.; LIN, J.; HANDSCHIN, C.; YANG, W.; ARANY, Z.P.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L.; SPIEGELMAN, B.M. PGC1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppression FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 103, n. 44, p. 16260-16265, 2006.

SHAH, O.; JAMEEL, J.C.; ANTHONY, S.R.; KIMBAL, S.R.; JEFFERSON, L.S. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, United Sates, v. 279, n.5, p. E715–E729, 2000.

SHACKELFORD, L.C.; LEBLANC, A.D.; DRISCOLL, T.B.; EVANS, H.J.; RIANON, N.J.; SMITH, S.M.; SPECTOR, E.; FEEBACK, D.L.; LAI, D. Resistance exercise as a

countermeasure to disuse-induced bone loss. **Journal Applied of Physiology**, United States, v. 97, n. 1, p. 119-129, 2004.

SLATER, G.; JENKINS, D.; LOGAN, P.; VUKOVICH, M. ; RATHMACHER, J.A. ; HAHN, A.G. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation does not affect changes in strength or body composition during resistance training in trained men. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, United States, v. 11, n. 3, p. 384-396, 2001.

SMITH, H.J.; WYKE, S.M.; TISDALE, M.J. Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in skeletal muscle by β -Hydroxy- β -Methylbutyrate. **Cancer Research**, United States, v. 64, n. 23, p. 8731-8735, 2004.

SMITH, H.J.; WYKE, S.M.; TISDALE, M.J. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by β -Hydroxy- β -Methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. **Cancer Research**, United States, v. 65, n. 1, p. 277–283, 2005.

SOARES, A.G.; AOKI, M.S.; MIYABARA, E.H.; DELUCA, C.V.; ONO, H.Y.; GOMES, M.D.; et al. Ubiquitin-ligase and deubiquitinating ligase gene expression in stretched rat skeletal muscle. **Muscle & Nerve**, United States, v. 36, n. 5, p. 685-693, 2007.

STAUBER, W.T.; MILLER, G.R.; GRIMMETT, J.G.; KNACK, K.K. Adaptation of rat soleus muscles to 4 wk of intermittent strain. **Journal Applied of Physiology**, United States, v. 77, n. 1, p. 58-62, 1994.

STEVENSON, E.J.; GIRESI, P.G.; KONCAREVIC, A.; KANDARIAN, S.C. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, United States, v. 551, n.15, p.33-48, 2003.

STEIN, T.P.; WADE, C.E. Metabolic consequences of muscle disuse atrophy. *The journal of nutrition*, United States, v. 135, p. 1824S-1828S, 2005.

STIPANUK, M.H. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. **Nutrition Reviews**, United States, v. 65, n.3, p. 122-129, 2007.

TAILLANDIER D, AUROUSSEAU E, MEYNIAL-DENIS D, BECHT D, FERRARA M, COTTIN P, et al. Coordinate activation of lysosomal, Ca^{2+} -activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. **Biochemical Journal**, England, v. 316, n. 1, p. 65–72, 1996.

TATSUMI, R.; LIU, X.; PULIDO, A.; MORALES, M.; SAKATA, T.; DIAL, S.; et al. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, United States, v. 290, v. 6, p. C1487-C1494, 2006.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiological Reviews**, United States, v. 89, n. 2, p. 381-410, 2009.

TISDALE, M. J. The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting. **The journal of supportive oncology**, United States, v.3, n.3, p. 209-17, 2005.

TISCHLER, M. E.; DESAUTELS, M.; GOLDBERG, A. L. Does leucine, leucyl-tRAN, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation and cardiac muscle. **The journal of biological chemistry**, United States, v. 257, n. 4, p. 1613-1621, 1982.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

THOMAS, G.; HALL, M.N. TOR signaling and control of cell growth. **Current Opinion in Cell Biology**, United States, v. 9, n. 6, p. 782-787, 1997.

THOMASON, D. B.; BOOTH, F. W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. **Journal of applied physiology**, United States, v. 68, n. 1, p. 1-12, 1990.

THOMASON, D.B.; BIGGS, R.B.; BOOTH, F.W. Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA unweighted soleus muscle. **American journal of physiology**, v. 257, p. R300-R305, 1989.

THOMASON, D.B.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K.M. Activity influences on soleus muscle myosin during rodent hindlimb suspension. **Journal applied of physiology**, United States, v. 63, n. 1, p. 138-144, 1987.

THOMSON, J.S.; WATSON, P.E.; ROWLANDS, D.S. Effects of nine weeks of β -hydroxy- β -methylbutyrate supplementation on strength and body composition in resistance trained men. **Journal of strength and conditioning research**, United States, v. 23, n. 3, p. 827-835, 2009.

TSIKA, R.W.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K.M. Time course adaptations in rat skeletal muscle isomyosins during compensatory growth and regression. **Jornal Applied of Physiology**, United States, v. 63, n. 5, p. 2111-2121, 1987.

TRAN, H.; BRUNET, A.; GRIFFITH, E.C.; GREENBERG, M.E. The many forks in FOXO's road. **Science's STKE**, United States, n. 172, p. 1-11, 2003.

VAN KOEVERING, M.; NISSEN, S. Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, United States, v.262, p. E27-31, 1992.

VEAL, E.A.; DAY, A.M.; MORGAN, B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular cell**, United States, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2007.

VENTADOUR, S.; ATTAIX, D. Mechanisms of skeletal muscle atrophy. **Current opinion in rheumatology**, United States, v. 18, n. 6, p. 631-635, 2006.

VERMAELEN, M.; SIVEBT, P.; RAYNAUD, P.; ASTIER, C.; MERCIER, J.; LACAMPAGNE, A.; CAZORLA, O. Differential localization of autolyzed calpains 1 and 2 in slow and fast skeletal muscles in the early phase of atrophy **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, United States, v. 292, n. 6, p. C1723-C1731, 2007.

VUKOVICH, M.D.; STUBBS, N.B.; BOHLKEN, R.M. Body composition in 70-year-old adults responds to dietary β -Hydroxy- β -Methylbutyrate similarly to that of young adults. **The Journal of Nutrition**, United States, v. 131, n. 7, p. 2049-2052, 2001.

ZANCHI, N. E.; NICASTRO, H.; LANCHA Jr., A. H. Potencial antiproteolytic effects of L-leucine: observations of in vitro and in vivo studies. **Nutritions and Metabolism**, England, v.5, n. 20, p. 1-7, 2008.

ZHAO, J.; BRAULT, J.J.; SCHILD, A.; GOLDBERG, A.L. Coordinate activation of autophagy and the proteasome pathway by FoxO transcription factor. **Autophagy**, United States, v. 4, n. 3, p. 378-380, 2008.

WAALKES, T.P.; UDENFRIEND, S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, United States, v. 50, n. 5, p. 733-736, 1957.

WANG, X.; PROUD, C.G. The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis. **Physiology**, England, v.21, p. 362-369, 2006.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, United States, v. 4, n. 4, p. 476-478, 1958.

WILLIAMS, P.E. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. **Annals of the Rheumatic Diseases**, England, v. 47, n. 12, p. 1014-1016, 1988.

WILEY, D.B.; DOBBINS, T.A. **Composition and method for enhancing the bioavailability of calcium and magnesium in dietary supplements and food additives**. United States Patent.; 20040220266, 2004.

WILSON, J.M.; KIM, J.S.; LEE, S.R.; RATHMACHER, J.A.; DALMAU, B.; KINGSLEY, J.D.; KOCH, H.; MANNINEN, A.H.; SAADAT, R.; PANTON, L. Acute and timing effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on indirect markers of skeletal muscle damage. **Nutrition and metabolism**, England, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2009.

WILSON, G.J.; WILSON, J.M.; MANNINEN, A.H. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: A review. **Nutrition and metabolism**, United States, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2008.

XU, M.; NAKAI, N.; ISHIGURE, K.; NONAMI, T.; NAGASAKI, M.; OBAYASHI, M., LI, Z.; SATO, Y.; FUJITSUKA, N.; MURAKAMI, T.; SHIMOMURA Y. The alpha-

ketoisocaproate catabolism in human and rat livers. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v.276 n.3, p.1080-1084, 2000.